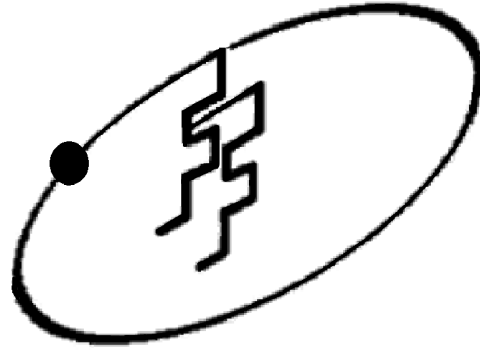


UNIVERSIDAD DE LA HABANA.

FACULTAD DE FÍSICA.



Modelando las mutaciones en bacterias y tejidos humanos

Tesis de Diploma
presentada en opción al grado de
Licenciado en Física

Autor: Dario Alejandro León Valido, Facultad de Física.

Tutor: Augusto González García, ICIMAF.

La Habana, Cuba.

2016

familia y amigos: lo logré!!!

Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer al Dr. Rolando Pérez y al Lic. Jorge Fernández de Cossío, ambos pertenecientes al CIM, por acceder a formar parte del tribunal y realizar una muy buena oponencia en tiempo récord. Hicieron una exhaustiva revisión de la tesis, así como de todos los artículos citados; la cual conllevó un debate conmigo en el CIM. Gracias por invitarme a almorzar, los que me conocen bien saben cuanto significa eso para mí.

En especial, debo agradecer a mi tutor: Augusto González, el cual no sólo ha sido mi modelo de físico a seguir, sino también como persona. Me ha mostrado cómo podemos interesarnos, opinar y actuar sobre diversas ramas de la sociedad, como el arte, la política y la economía a un nivel más riguroso y responsable para lograr aportar e influenciar en la toma de decisiones importantes para el desarrollo del país, sobretodo de la ciencia, renglón altamente limitado en Cuba. Sigo las ideas planteadas en su bloc (<http://augustoesm.blogspot.com/>) y espero alcanzar suficiente madurez para que mis opiniones sean escuchadas y respetadas tanto como las suyas.

Le agradezco infinitamente a mi familia por apoyarme durante toda mi vida en cada cosa que se me ha ocurrido emprender. A mi madre, a mi hermana Daniela y a mi novia Emely por estar ahí conmigo en la realización de la tesis, perdiendo horas de sueño, tecleando si hacía falta y alimentándome (tarea sumamente difícil).

A los profesores que me formaron, desde Etien en el 12 grado en la universidad con su rigurosidad extrema. Gretel, a quien le pregunté sin cesar, casi todas las dudas que me surgieron en la carrera y, después de ese constante bombardeo, por ser parte del tribunal y no devolverme todo el fuego que me merecía. A Lídice, que además de ser una excelente profesora también ha sido una muy buena amiga, sé que de haber sido falta hubiera ejercido como oponente de mi tesis. A todos los profesores de la carrera, siempre estaré dispuesto a devolver a las nuevas generaciones, todo lo que me han enseñado.

Al colectivo del ICIMAF, por permitir integrarme a su entorno de trabajo, un ambiente realmente agradable, en el cual desarrollé junto a mi tutor el grueso de la investigación. Por estar pendiente de mi bienestar e invitarme a cuanto evento se desarrollase.

A mis compañeros, por permanecer a mi lado durante toda la carrera. Realmente me divertí y la pasé bien y espero que podamos seguir haciéndolo en lo adelante. Fue realmente refrescante nuestro estado de cuasi-felicidad, el cual nos permitió hacer “sugerencias” durante las clases, jugar cancha después de haber salido más o menos, bien o mal en las pruebas; Ale y Omar. Formar Incertidumbre Combinada, nuestro grupo de la facultad y seguir tocando aún cuando no sepamos cómo continuar; Alfredo. De algún modo, seguiré haciendo esas cosas que tanto me gustan a la par de la Física, ya que sin alguna de ellas no pudiera continuar.

Algunos no pudieron presenciar mi defensa, pero sé que estuvieron apoyándome desde la distancia. Mi padre, por ejemplo y mi buen amigo Heiner, quien desde el 12 grado me traía problemas interesantes para discutir conmigo, como los Problemas del Milenio: 7 problemas matemáticos que su resolución sería premiada con 1 millón de dólares cada uno. Dejando de lado el trofeo, su motivación ha sido impulsora de mi desarrollo intelectual.

Al resto de mis amigos, como Andrés, quien no sólo me proporcionó un algoritmo de ordenamiento de listas recurrente mucho más eficiente del que yo me sabía, sino que lo he molestado en su casa recurrentemente a cualquier hora. En fin, a todo aquel que de alguna manera ha estado pendiente de mi desarrollo y/o me ha brindado su ayuda, aunque no lo haya mencionado explícitamente o crea que su aporte es insignificante, siéntase incluido cuando digo que esta tesis no hubiera sido posible sin USTEDES.

Resumen

Esta tesis tiene el propósito de estudiar las mutaciones, entendidas como trayectorias en el espacio de configuraciones del ADN (todas las combinaciones de bases). En ella se propone un modelo evolutivo para las mismas mediante trayectorias de Levy. Los parámetros del modelo se estiman a partir de datos provenientes de Experimentos de Evolución a Largo Plazo (EELP) con bacterias *E. Coli*. A partir de dicho modelo se simulan varios resultados de los experimentos como la aparición de nuevos genotipos y su competencia. La selección natural se incluye en el modelo a través del parámetro de *fitness*, el cual caracteriza la “salud” de cada genotipo bajo determinadas condiciones ambientales. Además, se discute cualitativamente la analogía encontrada entre los fenotipos mutantes de las bacterias y las células cancerosas. Se analiza el papel de la radiación como fuente de mutaciones, en especial la proveniente de la desintegración del radón presente en el aire que respiramos.

Abstract

This thesis is aimed at studying mutations, understood as trajectories in the DNA configuration space. An evulsive model of mutations in terms of Levy flights is proposed. The parameters of the model are estimated by means of data from the Long-Term Evolution Experiment (LTEE) with *E. Coli* bacteria. The results of simulations on competition of clones, mean fitness, etc are compared with experimental data. We discuss the qualitative analogy found between the bacterial mutator phenotype and the cancerous cells. The role of radiation as source of mutations is analyzed. We focus on the case of Radon’s decay in the lungs in breathing.

Contenido

Prólogo	1
1 Introducción	2
1.1 Mutaciones en bacterias	2
1.1.1 El ciclo del desarrollo celular. Replicación del ADN	2
1.1.2 Mecanismos de corrección y mutaciones	3
1.1.3 Mutaciones y Selección Natural	4
1.1.4 Factores externos en las mutaciones	4
1.1.5 El experimento de evolución a largo plazo en poblaciones de <i>E. Coli</i> . .	5
1.2 Mutaciones en tejidos humanos	5
1.2.1 Identidad del ADN del individuo	5
1.2.2 División celular en organismos pluricelulares. Especialización	6
1.2.3 Mecanismos de corrección a nivel celular y el sistema inmunológico . . .	7
1.2.4 Cáncer	8
1.2.5 Envejecimiento y cáncer	9
1.2.6 Datos sobre riesgo de cáncer en tejidos	10
1.3 Radiaciones ionizantes y mutaciones	10
1.3.1 Dosis de radiación	10
1.3.2 Dosis en los diferentes tejidos	12
1.3.3 Datos sobre la concentración de Radón y cáncer	13
2 Mutaciones y trayectorias de Levy	15
2.1 El carácter acumulativo de las mutaciones	15
2.2 Las mutaciones como trayectorias en el espacio de las configuraciones del ADN .	17
2.3 Midiendo los cambios en el ADN	17
2.4 Trayectorias de Levy	19
2.5 Datos sobre mutaciones puntuales en el EELP	20
2.6 Datos sobre mutaciones no locales en el EELP	22
2.7 Descripción del <i>fitness</i> en el EELP	22
2.8 Simulando las mutaciones + la selección natural en el EELP	25
2.9 Aparición del genotipo mutante en el EELP	30
2.10 EELP y cáncer	33

2.11	Probabilidades de impacto de las radiaciones sobre las células madres del pulmón	34
3	Conclusiones y Recomendaciones	37
3.1	Conclusiones	37
3.2	Recomendaciones	38
	Anexos	40
A	Datos de riesgo de cáncer en tejidos	41
B	Coeficientes de la dosis	43
B.1	Peso de la radiación	43
B.2	Sensibilidad del tejido	43
	Bibliografía.	45

Prólogo

Esta tesis contiene nuestras ideas de cómo concebir las mutaciones, que son el fruto de más de 2 años de trabajo, estudio y búsqueda de información. A lo largo de este proceso, hemos tenido la necesidad de estudiar temas de biología, para entender la enorme cantidad de procesos biológicos que subyacen de trasfondo en nuestro problema. La mayoría de ellos son explicados en el primer capítulo introductorio de manera simple y enfocados en los principales aspectos que nos interesa desarrollar, por lo que pudiera servir de guía para introducirse en esta extensa e interesante rama de la ciencia, que es la Biología. Varias secciones de la tesis están pensadas con el objetivo de que sirvan de base para el desarrollo de futuras investigaciones, ya que aún hay mucho por hacer y descubrir en lo referente a las mutaciones. Como podrá apreciar el lector en el segundo capítulo, esta tesis pudiera ser ejemplo, en mi más humilde opinión, de cómo nosotros, físicos al fin, podemos investigar temas tan diversos y alejados de nuestra formación inicial. También, de nuestra necesidad de pasar de descripciones cualitativas a modelos matemáticos, para entender mejor la naturaleza de los sistemas.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Mutaciones en bacterias

1.1.1 El ciclo del desarrollo celular. Replicación del ADN

Las células se reproducen duplicando su contenido y luego dividiéndose en dos. En especies unicelulares como las bacterias, cada división produce un organismo adicional. Los detalles del ciclo en cada caso pueden variar, pero los requerimientos son universales. En primer lugar, se debe replicar satisfactoriamente el ADN de la célula progenitora y luego los cromosomas replicados deben segregarse en células separadas. El ciclo de división involucra un conjunto de procesos, los cuales son agrupados por fases. La vasta mayoría de las células también duplica sus masas y sus orgánulos, para ello deben estar coordinados una serie de procesos citoplasmáticos y nucleares. Existe un sistema de control del ciclo que regula el proceso como un todo. Nuestro interés está encaminado a entender cómo se producen los errores genéticos que pasan a otras generaciones, por tanto, debemos enfocarnos en el proceso de replicación del ADN nuclear que ocurre durante una parte específica de la interfase: la fase S, y en el papel que juega el sistema de control.

El sistema de control del ciclo celular es un dispositivo bioquímico que opera cíclicamente. Está construido a partir de un grupo de proteínas interactuantes que inducen y coordinan los procesos de forma jerárquica. Dichas proteínas pueden detener al ciclo en puntos de chequeo específicos, reunir información para verificar el cumplimiento de la jerarquía, retroalimentarse y actuar en consecuencia; todo mediante mecanismos bioquímicos. Las pausas también son importantes para permitir cierta regulación del sistema de control. Esta regulación se da generalmente en dos puntos: justo antes de iniciar la fase S y a la entrada de la mitosis, donde se realiza el reparto equitativo del material hereditario [1].

La replicación del ADN ocurre a ritmos de polimerización cercanos a 500 nucleótidos por segundo en bacterias y a 50 en mamíferos. Claramente las proteínas que la catalizan son rápidas y precisas. Estas propiedades se logran mediante complejas multienzimas que guían el proceso y constituyen una elaborada “máquina de replicación”. Primero se desenrolla la estructura de doble hélice que forman las dos cadenas de bases del ADN. Luego se eliminan los enlaces por

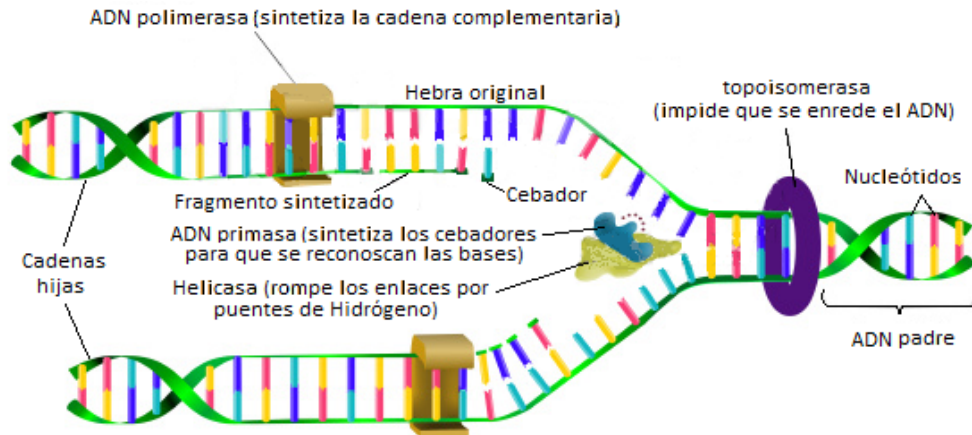


Figura 1.1: Algunos procesos y enzimas que participan en la replicación del ADN.

puentes de hidrógeno existentes entre las bases complementarias de cada cadena. Una vez separadas, cada cadena hace de plantilla para la síntesis de una nueva (Fig (1.1)). Como cada molécula de ADN hija se queda con una cadena de la madre, el proceso de replicación se dice que es semiconservativo. Gracias a la complementación existente entre las bases que forman al ADN, las moléculas hijas serán iguales a la madre. Durante la replicación actúan moléculas que evitan que el ADN se enrede.

1.1.2 Mecanismos de corrección y mutaciones

Como todo proceso celular, la replicación se basa en el reconocimiento molecular [1], cuyo primer paso es la difusión. Los encuentros entre moléculas ocurren aleatoriamente por simple difusión térmica, es por eso que los procesos de reconocimiento no son perfectos. La estructura de doble hélice del ADN es un mecanismo efectivo para garantizar una buena copia, pero no está libre de errores: ocurren alrededor de uno por 10^4 o 10^5 bases [1]. Este valor es asombrosamente pequeño, no obstante, esta tasa de error no pudiera mantener la integridad del genoma humano que es de aproximadamente 3×10^9 bases [1]. Existen mecanismos de reparación del ADN encargados de mejorar la fidelidad de la copia. Por ejemplo, luego de la duplicación del ADN, bloques de re-replicación aseguran que ningún segmento sea copiado más de una vez. Estos bloques son retirados al pasar a la mitosis. Existe otro mecanismo de reparación de fallas que difiere de la mayoría de los sistemas de reparación del ADN, el cual no depende de la presencia de nucleótidos anormales que puedan ser detectados y extirpados. En cambio, detecta distorsiones en el exterior de la hélice que resultan de un apareamiento de bases no compaginado. El resultado final de la copia con los arreglos es de un error en 10^9 bases adicionales [1]. Muy raramente la máquina de replicación se salta o adiciona nucleótidos, o pone T por C, o A por G. Cada tipo de cambio del ADN constituye una mutación que se copia en las siguientes generaciones como la secuencia correcta. A los intercambios puntuales de bases que emergen de la replicación se les llama mutaciones “espontáneas” y tienen un carácter local.

1.1.3 Mutaciones y Selección Natural

En un proceso evolutivo celular no siempre podremos notar todas las mutaciones que se han producido en instantes anteriores, ya que una mutación en un gen puede inactivar una proteína crucial y causar la muerte de la célula, entonces se pierde. Las mutaciones que disminuyen grandemente la capacidad del individuo para sobrevivir y/o reproducirse son llamadas “deletéreas”. Por otro lado, puede ocurrir una mutación “silenciosa” fuera del sitio activo de la proteína y no afectar su función correspondiente, permaneciendo inactiva. Rara vez una mutación crea un gen con una mejora o función útil. En este caso los organismos mutantes tienen una ventaja y el gen mutado eventualmente reemplaza al original por selección natural. Estas mutaciones se fijan y pueden ser observadas en la gran mayoría de la descendencia [1, 2, 3], constituyen una nueva característica del genotipo de la especie. La influencia del ambiente es esencial en el proceso selectivo porque es quien dicta las reglas de la competencia, determina significativamente las características fenotípicas de los organismos y también, de manera indirecta a través de las mutaciones, las características genotípicas promedio de la población. Existe un parámetro llamado *fitness* que describe la supervivencia de cada genotipo emergente de la evolución. Un genotipo con más “salud” aumentará su frecuencia de aparición en las generaciones siguientes, por tanto, el *fitness* es un parámetro que caracteriza la evolución de las mutaciones.

En la literatura existen numerosas definiciones de *fitness*, sin embargo, todas ellas concuerdan aproximadamente en la esencia de la idea [4]: el *fitness* involucra la habilidad de los organismos o, más raramente, poblaciones o especies para sobrevivir y reproducirse en el medio ambiente en el cual están inmersos [4]. Por tanto, podemos referirnos al *fitness* individual, colectivo de una población de organismos o relativo entre individuos o poblaciones.

1.1.4 Factores externos en las mutaciones

Existen mutaciones no espontáneas que no provienen de errores en el proceso de replicación. Ellas involucran mutágenos: agentes químicos, biológicos o físicos que alteran la información genética de un organismo, lo cual incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural [1]. Generalmente producen cambios no locales que involucran un reajuste (inserción, pérdida, inversión, etc.) de un segmento de la molécula de ADN [1]. Los mutágenos biológicos son aquellos organismos vivos que pueden alterar la secuencia del material genético de su hospedador como los virus. Los mutágenos químicos son compuestos capaces de alterar las estructuras del ADN de forma brusca. Los ejemplos más cotidianos de mutágenos físicos son las distintas radiaciones que reciben los organismos y que pueden romper los enlaces de la molécula de ADN. En condiciones normales los mutágenos químicos y biológicos son mucho más controlables; mientras que los físicos, aun aislando a los organismos de la radiación externa, están presentes en la desintegración de algunas de las partículas componentes de los mismos.

1.1.5 El experimento de evolución a largo plazo en poblaciones de *E. Coli*

El profesor R. Lenski y su grupo, en la Universidad de Michigan han llevado a cabo un experimento de evolución a largo plazo con bacterias *E. Coli* por casi 30 años, con el objetivo de estudiar las dinámicas fenotípicas y genotípicas de poblaciones de bacterias. Cada día las bacterias se replican 6 o 7 generaciones de evolución binaria, alcanzando 3 400 generaciones en un año, lo que representa poblaciones crecidas por más de 60 000 generaciones hasta la fecha [5]. En el experimento, 12 cultivos de bacterias con un ancestro común evolucionan independientemente. Cada día 0.1 ml del caldo bacterial es transferido rigurosamente a 9.9 ml de solución de glucosa, mantenido a temperatura controlada hasta el día siguiente. En las primeras 8 horas el número de bacterias varía aproximadamente de acuerdo con la ley $N_0 2^t/t_0$, que es consistente con la forma de reproducción: la división celular por mitosis. Luego que la glucosa se consuma, se alcanza un estado estacionario: en las restantes 16h no hay mortalidad apreciable [5].

Entre los resultados del experimento se encuentran el *fitness* relativo a la cepa ancestral [3], datos sobre mutaciones puntuales [6, 7] y sobre reajustes grandes en los cromosomas [8]. Más adelante estos datos serán utilizados en el trabajo.

1.2 Mutaciones en tejidos humanos

1.2.1 Identidad del ADN del individuo

El ADN del genoma de un organismo, que es el mismo en todas sus células, puede dividirse conceptualmente en dos: el que codifica proteínas (los genes) y el que no. En la mayoría de las especies pluricelulares, al contrario de las bacterias, sólo una pequeña fracción del genoma codifica proteínas. Por ejemplo, alrededor del 1.5% del genoma humano consiste en exones que codifican proteínas (20 000 a 25 000 genes), mientras que más del 90% consiste en ADN no codificante [1]. Existen regiones no codificantes que aparentemente no tienen función alguna: el llamado “ADN basura”. Otras secuencias no codificantes tienen afinidad hacia proteínas especiales que tienen la capacidad de unirse al ADN, con un papel importante en el control de los mecanismos de transcripción y replicación. A estas secuencias se les llama frecuentemente “secuencias reguladoras”, porque están encargadas de la activación o la supresión de la expresión genética. Ellas no codifican proteínas, pero sí se transcriben a ARN: ribosómico, de transferencia y de interferencia (ARNi, que son los ARN que bloquean la expresión de genes específicos) [1]. Por otro lado, algunas secuencias de ADN desempeñan un papel estructural en los cromosomas: los telómeros y centrómeros contienen pocos o ningún gen codificante de proteínas, pero son importantes para estabilizar la estructura de los cromosomas. Las estructuras de intrones y exones de algunos genes, son importantes por permitir los cortes y empalmes alternativos del pre-ARN mensajero que hacen posible la síntesis de diferentes proteínas a partir de un mismo gen (sin esta capacidad no existiría el sistema inmune, por ejemplo) [1]. Algunas secuencias de ADN no codificante representan pseudogenes que tienen valor evolutivo, ya que permiten la creación de nuevos genes con nuevas funciones. Otros ADN no codificantes proceden de la

duplicación de pequeñas regiones del ADN [1, 5], lo que pudiera ser otro mecanismo contra la aparición de mutaciones, ya que los daños quedarían repartidos entre más bases y las regiones afectadas pueden ser reparadas a partir de sus duplicados. El rastreo de secuencias repetidas en el ADN permite estudios de relaciones de parentesco (filogenética) [1].

1.2.2 División celular en organismos pluricelulares. Especialización

Los organismos pluricelulares pueden ser vistos como una sociedad o ecosistema donde cada miembro individual es una célula, los cuales se reproducen por división celular y se organizan en ensambles de colaboración o tejidos [1]. Dado la gran cantidad de células que poseen estos organismos, hacen falta muchas rondas de divisiones para que, a partir de una, surja un nuevo individuo. Muchos organismos como aves y mamíferos dejan de crecer cuando alcanzan un tamaño determinado, pero, incluso cuando el crecimiento se detiene, siguen proliferando células [1]. En la adultez, la división celular también es necesaria para reemplazar células desgastadas por su constante uso, perdidas por heridas o que sufrieron una muerte programada (apoptosis), de modo que el organismo como un todo permanece invariante [1]. La apoptosis puede darse como mecanismo de eliminación de células inservibles para el tejido porque están dañadas y no cumplen con su función, para autorregular su crecimiento y desarrollo o, simplemente, para controlar la cantidad de células en el tejido [1]. Un humano adulto puede producir millones de células nuevas en un segundo para mantener su estado de equilibrio y, si se detuvieran todas sus divisiones celulares, moriría en unos días [1]. En un instante dado la mayoría de las células en la adultez no están creciendo o dividiéndose, en cambio están en un estado de descanso: perfeccionando su función especializada mientras se retiran del ciclo celular. [1]

La mayoría de las poblaciones de células diferenciadas en vertebrados están muriendo y siendo reemplazadas continuamente. La regeneración requiere de un crecimiento coordinado de los componentes del tejido. Las nuevas células pueden ser producidas de dos maneras: por replicación simple de células del mismo tipo (sin cambios de especialización) o, por células madres relativamente no diferenciadas en procesos que involucran cambios del fenotipo de las células [1]. La diferenciación se va dando de manera gradual en la descendencia a partir de cambios epigenéticos: que no modifican al ADN; no por mutaciones, que también están presentes [1]. Este proceso es posible gracias a que los sectores no codificantes del ADN regulan la activación de los genes y, estos pueden ser silenciados a conveniencia para que la célula cumpla una función determinada [1]. El principal mecanismo de la epigenética es la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases (metilación) para alterar la transcripción genética [1].

Se requieren células madres dondequiera que exista una necesidad recurrente de reemplazar células diferenciadas que no puedan dividirse por sí mismas. Este es el caso de la incompatibilidad del estado final de la diferenciación con la división celular en muchos tejidos. La poca diferenciabilidad de las células madres radica en que no se encuentran al final de una cadena de especialización [1]. Las células madres también pueden dividirse sin límites hasta el final de la vida del organismo. Cada una de sus hijas puede permanecer como célula madre o embarcarse en un curso irreversible hacia el final de la diferenciación [1]. Las tasas de renovación varían de un tejido a otro: pueden ser de días, como las paredes epiteliales del intestino delgado

(renovadas por células madres), o de un año y más, como en el páncreas (renovadas por simple duplicación) [1, 9]. Muchos tejidos con bajas tasas de renovación pueden ser estimulados para producir nuevas células en grandes cantidades cuando haga falta, por ejemplo en casos de infección [1].

No todas las poblaciones de células especializadas en el cuerpo están sujetas a renovación. Algunas son generadas en el embrión en números apropiados y se retienen hasta la adultez [1]. Al parecer, estas poblaciones nunca se dividen y no pueden ser reemplazadas si se pierden. En mamíferos son de este tipo casi todas las células nerviosas, las células musculares del corazón, las células de los pelos auditivos del oído y las células de la lente del ojo. Todas estas células tienen largos períodos de vida y necesariamente viven en ambientes protegidos. Son diferentes en otros sentidos y no se sabe una razón en general de por qué deberían ser irremplazables. Hay muy pocas tan inmutables como las fibras de las lentes, las demás son capaces de renovar sus partes componentes a pesar de no replicarse [1].

1.2.3 Mecanismos de corrección a nivel celular y el sistema inmunológico

El daño en el ADN inicia una respuesta que activa diferentes mecanismos de reparación que reconocen lesiones específicas en la molécula y son reparadas en el momento [1]. Alternativamente, si el daño genómico es demasiado grande, la célula puede caer en un estado irreversible de inactividad llamado senescencia [1]. En casos extremos de daños no reparables, los mecanismos de control a nivel celular inducirán la activación de una serie de rutas celulares que culminarán en la muerte celular [1]. Según el tipo de daños que ha sufrido la estructura de doble hélice del ADN, han evolucionado una variedad de estrategias de reparación que restauran la información perdida [1]. Si es posible, las células utilizan la cadena de ADN complementaria como “plantilla” para restaurar la información original de manera fidedigna [1]. Las roturas de cadena doble son especialmente peligrosas para la célula, ya que pueden provocar mutaciones en el genoma y son más difíciles de corregir. Existen dos mecanismos que reparan estas roturas: la unión de extremos no homólogos y la reparación recombinativa (también conocida como reparación asistida por plantilla o reparación de recombinación homóloga) [1]. El primer mecanismo busca secuencias homólogas cortas presentes en las colas de los extremos de ADN que deben ser unidos. Si estas secuencias son compatibles, la reparación suele ser correcta, pero también puede causar mutaciones durante la misma. La reparación recombinante requiere la presencia de una secuencia idéntica o casi idéntica que sea utilizada como plantilla para reparar la rotura. La maquinaria enzimática responsable de este proceso es muy parecida a la del cruce cromosómico durante la meiosis en la reproducción sexual [1]. Esta ruta permite que un cromosoma dañado sea reparado utilizando una cromátida hermana o un cromosoma homólogo como plantilla. Algunas roturas de cadena doble pueden ser causadas por intentos de replicación en una molécula de ADN con una rotura de cadena única o una lesión no reparada. Estos casos son reparados generalmente por recombinación [1].

Otro posible destino de células con un elevado daño genómico es convertirse en cancerosas. Estas células tienen un grado de mutabilidad que le permite hacer cambios en su metabolismo

y su proliferación de manera autónoma, burlando los controles de regulación del metabolismo y de la división celular del tejido [1]. Existen genes en el ADN que se utilizan para eliminarlas, los llamados genes supresores de tumores [1]. A este nivel, las células cancerosas son tratadas como cualquier otro agente patógeno introducido en el organismo, que produce daños y enfermedades. Para combatir estos males los vertebrados tienen una maquinaria de defensa muy bien desarrollada llamada sistema inmunitario [1]. El sistema inmune está compuesto por muchos tipos de proteínas, células, órganos y tejidos, los cuales se relacionan en una red elaborada y dinámica. Dicho sistema protege a los organismos de las infecciones con varias líneas de defensa [1]. Las más simples son las barreras físicas, que evitan que patógenos como bacterias y virus entren en el organismo. Si un patógeno penetra estas barreras, el sistema inmunitario innato ofrece una respuesta inmediata, pero no específica. Si los agentes patógenos evaden la respuesta innata, existe una tercera capa de protección: el sistema inmunitario adaptativo [1]. En él, se adapta la respuesta durante la infección para mejorar el reconocimiento del agente patógeno. Esta información se conserva aún después de que el agente sea eliminado, bajo la forma de memoria inmunitaria [1]. La capacidad de memorizar le permite al sistema inmune desencadenar ataques más rápidos y más fuertes en el futuro si se detectan los mismos tipos de patógenos. La inmunidad de un organismo depende de la habilidad de su sistema inmunitario para distinguir entre las moléculas propias y las que no lo son. Para ello se utiliza un tipo de células llamadas linfocitos, las cuales contienen moléculas receptoras que reconocen objetivos o blancos específicos [1]. En la respuesta inmediata se libera una clase de linfocitos llamados células B, las cuales producen anticuerpos estándares para la mayoría de las infecciones. En la inmunidad adaptativa se utilizan los linfocitos llamados células T, las cuales reconocen un objetivo no propio, sólo después de procesar pequeños fragmentos del patógeno (antígenos). La respuesta se elabora combinando el antígeno con receptores propios que se obtienen de la transcripción de fragmentos de ADN seleccionados, en principio, aleatoriamente [1].

1.2.4 Cáncer

Anteriormente hemos descrito la aparición de células cancerosas a partir de mutaciones, pero, en nuestra visión social de las células de un organismo, hemos omitido un factor fundamental en su evolución: la selección natural. No mencionamos ninguna competencia entre las células resultantes del proceso de división. La razón es que, en este sentido, un cuerpo saludable es una sociedad muy particular en la que el auto-sacrificio es una regla mucho más fuerte que la competencia [1]. Todos los linajes de células somáticas están destinados a morir sin dejar descendencia; dedicando su existencia, solo a sostener la de las células germinales, las cuales por sí mismas no podrían sobrevivir. Por tanto, a diferencia de células como las bacterias, las células de un organismo están obligadas a colaborar. Cualquier mutación que de riesgos de comportamientos egoístas en los miembros de la cooperativa celular pondrá en peligro el futuro de toda la empresa.

El cáncer es una enfermedad en la cual células mutantes individuales (cancerosas) comienzan a prosperar a costa de sus vecinos, se reproducen descontroladamente y al final terminan destruyendo toda la sociedad celular; por tanto, sus ingredientes básicos son las mutaciones,

la competencia y la selección natural [1]. Se clasifican de acuerdo al tejido u órgano del cual nacen. El desarrollo del cáncer como un proceso micro evolucionario ocurre en escalas temporales de meses o años [1]. Sus características difieren en dependencia del tipo de célula a partir de la cual se derivó. También tienen la propiedad hereditable de poder invadir y colonizar territorios normalmente reservados para otras células (metástasis) [1]. Incluso cuando un cáncer ha metastizado, se puede seguir un rastro genético hasta su origen: generalmente un tumor singular primario que surgió en cierto tejido [1]. En la mayoría de estas pruebas se presume que el tumor primario se derivó de la división celular de una única célula, la cual sufrió algún cambio hereditario en su ADN que le permitió sobrepasar a sus vecinos. Evidentemente, una mutación puntual no es suficiente para convertir una célula típicamente saludable en cancerosa. Muchas líneas de evidencias indican que la génesis del cáncer requiere que ocurran varios accidentes raros en una misma célula [1]. Mucha evidencia proviene de estudios epidemiológicos de la incidencia de cáncer como función de la edad. Si una sola mutación fuera responsable, ocurriendo con una probabilidad fija por año, la oportunidad de desarrollar cáncer en cualquier año debería ser independiente de la edad. Para la mayoría de los cánceres es un hecho que la probabilidad crece estrepitosamente con la edad, típicamente como una potencia cuadrada, cúbica, cuarta o quinta [1]. Para esas estadísticas se estima que deben haber ocurrido entre 3 y 7 eventos aleatoriamente independientes, cada uno de baja probabilidad, que son típicamente requeridos para convertir una célula en cancerosa. Los números más pequeños se aplican a casos de leucemia (cáncer en la sangre, no se forma tumor), mientras que los mayores se aplican a carcinomas (cáncer en células epiteliales o glandulares) [1].

1.2.5 Envejecimiento y cáncer

Teniendo en cuenta la influencia de factores externos en las mutaciones, podemos encontrar muchos cánceres cuyas ocurrencias correlacionan con una alta exposición de los individuos a alguno de estos factores. Para cánceres que poseen una causa externa apreciablemente discernible, casi siempre existe un tiempo de retraso grande entre los eventos causales y el comienzo de la enfermedad [1]. Por ejemplo, el cáncer de pulmón no comienza a crecer vertiginosamente hasta dentro de 10 o 20 años después de que la persona comenzara a fumar en gran medida, exponiéndose a sustancias carcinogénicas producidas en la combustión de los cigarrillos. También, la incidencia de leucemia en Hiroshima y Nagasaki no muestran un aumento considerable de casos hasta 5 años después de la explosión de las bombas atómicas, el máximo índice de enfermos se da transcurridos 8 años [1]. Pudiéramos citar más ejemplos. Durante este largo período de incubación las eventuales células cancerosas sufren una sucesión de cambios. La mayoría de las personas mueren de algún otro achaque antes de que el cáncer tenga tiempo de desarrollarse, pero no significa que no hayan cultivado células cancerosas durante su vida. Por el contrario, la frecuencia de grandes mutaciones y la tasa de eliminación de células dañadas en el organismo son bastante altas, lo que indica que constantemente se producen y eliminan un gran número de células cancerosas en el cuerpo [1]. Es una guerra sin fin entre el tumor queriendo crecer y el sistema inmune debilitándolo. Por eso, es necesario comprender cómo los distintos factores intervienen en la lucha, posibilitando o no, la aparición de la enfermedad. Un factor elemental

es el envejecimiento, no solo porque al pasar más tiempo se da chance a que aparezcan más mutaciones, sino también porque nuestra salud empeora y nuestras defensas decaen. Por estas razones son más frecuentes los canceres en edades avanzadas.

1.2.6 Datos sobre riesgo de cáncer en tejidos

Es bien conocido que existen grandes diferencias de incidencia de cáncer en los distintos tejidos del cuerpo. De los casi 100 tipos de cáncer detectados en humanos, los más comunes en hombres son los de pulmón, próstata, colorrectal y del estómago; mientras que en mujeres son los de mama, colorrectal, de pulmón y de cervical. Si se incluyera el cáncer de piel, en total representarían cerca del 40% de los casos [1]. Algunas de las diferencias están asociadas a factores de riesgo ya estudiados, como fumar, el uso abusivo del alcohol, radiación ultravioleta, o virus como el de papiloma humano. Pero esto se aplica solo a poblaciones expuestas a potentes mutágenos. Si comparamos datos de riesgo de padecer cáncer en la vida tomados de [9], esas exposiciones no pudieran explicar las diferencias entre, por ejemplo, los valores correspondientes a los tejidos del tracto alimenticio. Existe un factor de 24 entre el intestino grueso y el delgado, cuando supuestamente están expuestos a condiciones similares. En dicho trabajo se propone que la razón de estas diferencias es la presencia de otro factor: el efecto estocástico asociado al número de replicaciones que hacen las células madres de cada tejido en la vida de un individuo. Como existen órdenes de diferencia entre las frecuencias de replicación de las células madres de cada tejido, el riesgo de cáncer variará a consecuencia. Para demostrar que los efectos estocásticos constituyen un factor de riesgo de cáncer importante y pueden ser separados de la herencia y los factores ambientales, ellos calculan la correlación entre el riesgo (medido estadísticamente en una población) y estimados numéricos de dichos efectos. Los datos son mostrados en la Fig (1.2).

Si denotamos por r al riesgo y por N_{div} al número de divisiones en un tejido, podemos estimar N_{div} de la siguiente manera:

$$N_{div} = N_{cel} f_d \tau_v \quad (1.1)$$

donde N_{cel} es la cantidad de células madres presentes en el tejido (permanece constante debido al proceso de regulación de la mitosis), f_d es la frecuencia de división celular de cada tejido (cantidad de divisiones por año) y τ_v es el tiempo de vida medio de una persona (80 años).

Los datos de la Fig (1.2) fueron incluidos en el Anexo 1 junto a otros datos de interés de los tejidos, que también fueron tomados de [9].

1.3 Radiaciones ionizantes y mutaciones

1.3.1 Dosis de radiación

La magnitud que caracteriza la incidencia de radiación sobre un cuerpo es la dosis de radiación. Existen tres tipos [10]: la dosis absorbida D , la cual se define como la energía absorbida por unidad de masa y en el Sistema Internacional se da en Gray (J/Kg); la dosis equivalente, es

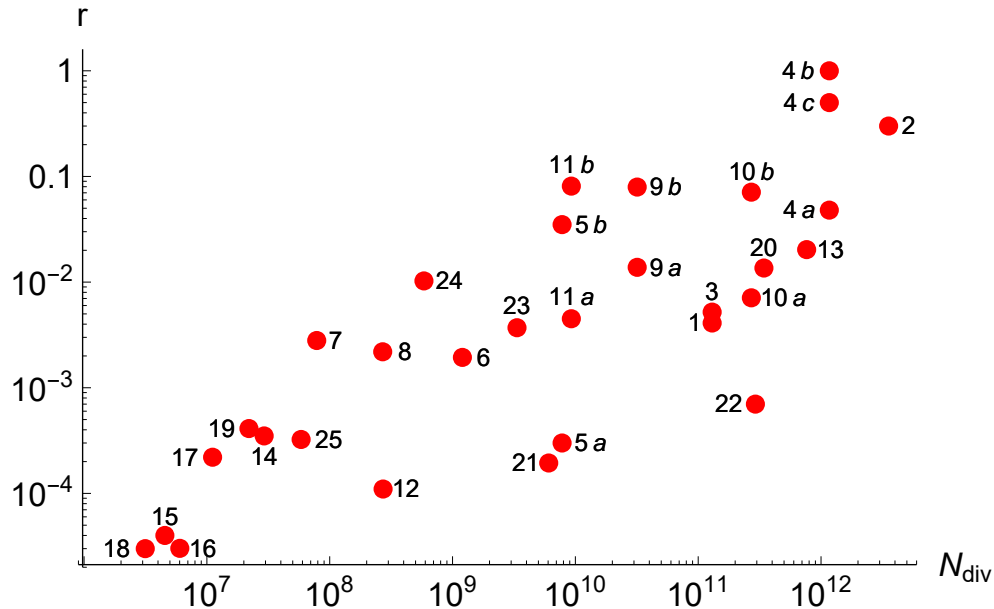


Figura 1.2: Relación entre el número de divisiones de las células madres en la vida de un tejido dado y su correspondiente riesgo de cáncer. 1: leucemia mieloide aguda, 2: carcinoma basocelular, 3: leucemia linfática crónica, 4a: cáncer colorrectal, 4b: cáncer colorrectal con PAF, 4c: cáncer colorrectal con síndrome de Lynch, 5a: cáncer de duodeno, 5b: cáncer de duodeno con PAF, 6: cáncer de células escamosas del esófago, 7: cáncer de vesícula no papilar, 8: glioblastoma, 9a: carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, 9b: carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello con VPH-16, 10a: hepatocarcinoma, 10b: hepatocarcinoma con hepatitis C, 11a: adenocarcinoma de pulmón (no fumadores), 11b: adenocarcinoma de pulmón (fumadores), 12: meduloblastoma, 13: melanoma, 14: osteosarcoma, 15: osteosarcoma de los brazos, 16: osteosarcoma de la cabeza, 17: osteosarcoma de las piernas, 18: osteosarcoma de la pelvis, 19: células germinales del ovario, 20: adenocarcinoma de células de los conductos pancreáticos, 21: carcinoma neuroendocrino pancreático, 22: adenocarcinoma del intestino delgado, 23: células germinales de los testículos, 24: carcinoma folicular/papilar de tiroides y 25: carcinoma de tiroides medular.

la suma de las contribuciones a la dosis de todos los tipos de radiación absorbida teniendo en cuenta que algunas son más dañinas que otras:

$$H = \sum_R w_R D_R, \quad (1.2)$$

w_R es un factor adimensional que caracteriza a cada radiación (alfa, beta, ...) y en el S.I. H se da en Sievert (Sv). La otra dosis es la dosis efectiva que está referida a un tejido en específico:

$$E_T = w_T H_T, \quad (1.3)$$

donde H_T es la dosis equivalente que recibe el tejido y w_T es un factor adimensional de peso que refleja la sensibilidad del tejido a la radiación. Está definido de tal forma que si H se distribuye homogéneamente por los tejidos, la suma de las dosis efectivas de los tejidos será igual a la dosis equivalente:

$$\sum_T w_T = 1. \quad (1.4)$$

De las tres dosis existentes la única medible es la absorbida, porque los factores w_R y w_T son cualitativos y son estimados a partir de datos experimentales, sobre todo a partir de datos provenientes de desastres nucleares de gran escala, por lo que pueden sufrir modificaciones según el aumento de los datos experimentales, en especial w_T . En el Anexo 2 aparecen datos de estos coeficientes para algunos tejidos, así como de los de la radiación, que fueron tomados de la Ref [10].

1.3.2 Dosis en los diferentes tejidos

Una vez conocidas las diferentes magnitudes que intervienen en la medición de los daños producidos por las diferentes radiaciones ionizantes sobre el cuerpo, debemos hacer un estudio detallado de su incidencia sobre los distintos tejidos humanos. De esta forma pudiéramos determinar cuáles son los más afectados, así como las fuentes más importantes. En la referencia [11] se hizo un minucioso estudio sobre este aspecto, al calcular estimados de dosis anuales que reciben todos los tejidos del cuerpo y analizar las fuentes más importantes de radiaciones. Los autores describen detalladamente todos sus procedimientos. En la tabla 1.1 se muestran datos de dosis anuales en dos años diferentes, que recibe nuestro organismo en nuestra vida cotidiana (tomados de la Ref. [11]). Las fuentes son clasificadas en naturales, donde se incluyen las principales radiaciones que nos llegan del medio ambiente; médicas, donde se toman en cuenta las distintas radiaciones que recibimos de dispositivos tecnológicos de la medicina que se utilizan para hacer diagnósticos o determinados tratamientos y el resto (consumo, industrial y de ocupación), son radiaciones provenientes de nuestra propia alimentación, del uso de algunas sustancias, de nuestro entorno de trabajo o de procesos industriales.

Como es de esperar, en los dos años hemos recibido aproximadamente la misma dosis de radiación natural. Sin embargo, en los veinte años de diferencia entre las dos mediciones, la dosis médica ha aumentado vertiginosamente producto del gran desarrollo tecnológico alcanzado. La

dosis que recibimos de fuentes no naturales prácticamente ha hecho duplicar la dosis total que recibimos anualmente.

Reporte No.160 del NCRP, datos de E.E.U.U.			
Dosis	1984		2004
Natural	3.0	2.0 Radón y Torio 1.0 Otros	3.11 2.28 Radón y Torio 0.83 Otros
Médica	0.53	0.39 Diagnósticos 0.14 Med. Nuclear	3.0 1.47 Tomografías 0.77 Med. Nuclear 0.76 Otros
Consumida	0.05-0.13		0.13
Industrial	0.001		0.001
Ocupacional	0.009		0.005
Total	3.6 mSv/año		6.2 mSv/año

Tabla 1.1: Reporte No.160 del NCRP, datos de E.E.U.U de la dosis de radiación anual recibida por persona.

1.3.3 Datos sobre la concentración de Radón y cáncer

De los datos anteriores podemos llegar a la conclusión que el pulmón es el órgano que se lleva la mayor parte de la dosis de radiación que recibe el cuerpo humano. Prácticamente todo el radón y torio y una buena parte de la que viene de procedimientos médicos. Con las radiaciones ionizantes que más lidiamos en la cotidianidad, teniendo en cuenta su grado de malignidad, resultan de la desintegración del radón o sus hijos, también radiactivos. Su isótopo más abundante es el ^{222}Rn , con una abundancia natural del 100%. Este se origina a partir de reacciones nucleares en las capas más altas de la atmósfera, contaminando el aire que respiramos. Además, es un gas noble, por lo que es poco reactivo y no se pierde en ninguna reacción atmosférica. Otros afluentes de su radiactividad provienen de cadenas de desintegración de elementos más pesados presentes en la tierra, como el isótopo de uranio: ^{238}U . En el reporte de Ref [12] también se informa la presencia de este isótopo en materiales constructivos, explicando así, la gran diferencia de actividad medida dentro y fuera de las viviendas (entiéndase cualquier construcción). Este elemento es gaseoso, pero la larga lista de sus productos radiactivos son metales (sólidos), por lo que la célula impactada por la primera desintegración recibe un daño adicional considerable.

Dada la gran influencia que ejerce el radón en nuestro cuerpo y bajo sospechas de posible causa de cáncer, los autores de la Ref [12] realizaron un minucioso estudio en pos de relacionar las altas concentraciones de radón en la atmósfera con la ocurrencia de cáncer. Ellos midieron su concentración en distintas ciudades de los E.E.U.U. con la intención de correlacionarla con el índice de casos de cáncer de pulmón (riesgo de padecer la enfermedad en la vida) en dichas localidades. Sus resultados son mostrados en la Fig (1.3). Resulta curioso el alto grado de

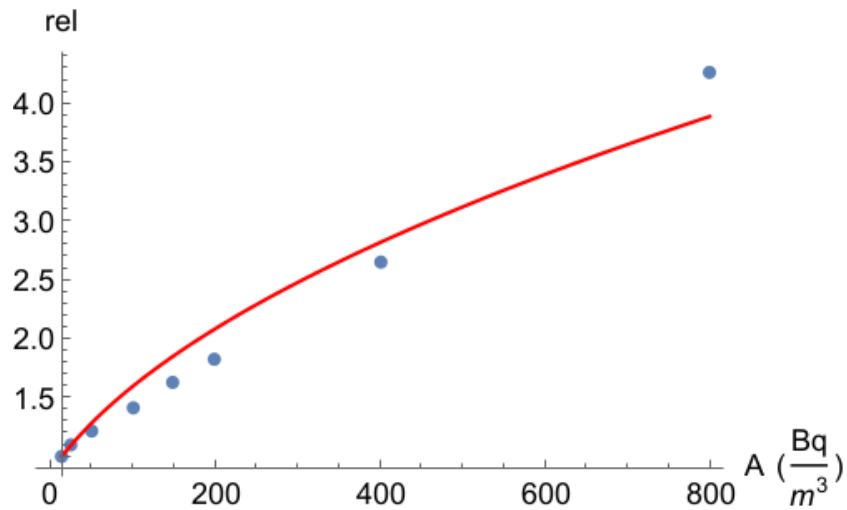


Figura 1.3: Aumento del riesgo de cáncer en función de la concentración de radón a la que estamos expuestos relativo al riesgo cuando no hay exposición. La línea continua representa un ajuste de los datos.

similitud que presentan con los datos de riesgo de cáncer en tejidos en función del número de divisiones de células madres de cada uno, presentados en Fig (1.2). Esto indica que la radiación en general es otro factor de riesgo, aunque aparentemente de menor peso, que debería tenerse en cuenta para mejorar la correlación de los datos de la Fig (1.2).

En la Fig (1.3) también se muestra un ajuste de los datos a partir de una dependencia potencial, que se obtiene de un modelo desarrollado para las mutaciones en el Capítulo 2. También, pudieran ser ajustados a una recta para calcular la probabilidad de ocurrencia de cáncer debido al radón. Algo parecido se hace con los datos de la Fig (1.2) en la sección 2.10.

Capítulo 2

Mutaciones y trayectorias de Levy

2.1 El carácter acumulativo de las mutaciones

En el Capítulo 1 nos referimos a la baja frecuencia (10^{-9}) con que se producen mutaciones puntuales en el ADN, como resultado de fallas en la etapa de replicación. Algunos cambios en el ADN pueden ser producidos en otras etapas del ciclo celular debido a procesos intrínsecos; como radicales libres dentro de la célula, o agentes externos, como radiaciones y sustancias tóxicas. Si estos cambios pasan la replicación del ADN y se heredan, también dan lugar a mutaciones.

En bacterias y otros organismos simples, las mutaciones son “filtradas” por el mecanismo de selección natural. Sólo los fenotipos más aptos persisten. En el hombre, por el contrario, la mayoría de las células tienen una vida muy corta y solamente los linajes de células madres pueden acumular cambios en el ADN, a lo largo de la vida del individuo.

En el proceso acumulativo, las mutaciones que involucran reajustes a gran escala pudieran ser fundamentales. Los tipos de reajustes más comunes son perdidas de fragmentos (deleciones), inserciones, desplazamientos (translocaciones) e inversiones. Estas últimas consisten en intercambiar las hebras de la doble cadena de ADN del fragmento y, aunque es un cambio de varias bases, no se pierde información, pero produce problemas en la codificación. Podemos analizar, por ejemplo, la ocurrencia de grandes mutaciones en las 12 poblaciones de bacterias del EELP [8] como se muestra en la Fig (2.1).

Los autores definen un reajuste en paralelo en poblaciones, como aquellos que involucran regiones cromosómicas que fueron afectadas por el mismo tipo de evento de reajuste: deleciones, inversiones, duplicaciones, etc. en al menos dos poblaciones distintas. El análisis de reajustes en paralelo en clones de poblaciones donde aparecen fenotipos mutantes, pudiera resolver qué mutaciones específicas le hacen falta al mutante. Sin embargo, los reajustes que se encuentran en común están presentes en casi todas las poblaciones, por lo que no lo caracterizan. La mayoría son deleciones de fragmentos duplicados, pedazos previamente introducidos por algún virus, otros sin ninguna función conocida (“basura”) o alguna mutación ligeramente beneficiosa [8].

La presencia de reajustes en paralelo en las poblaciones del EELP que evolucionan indepen-

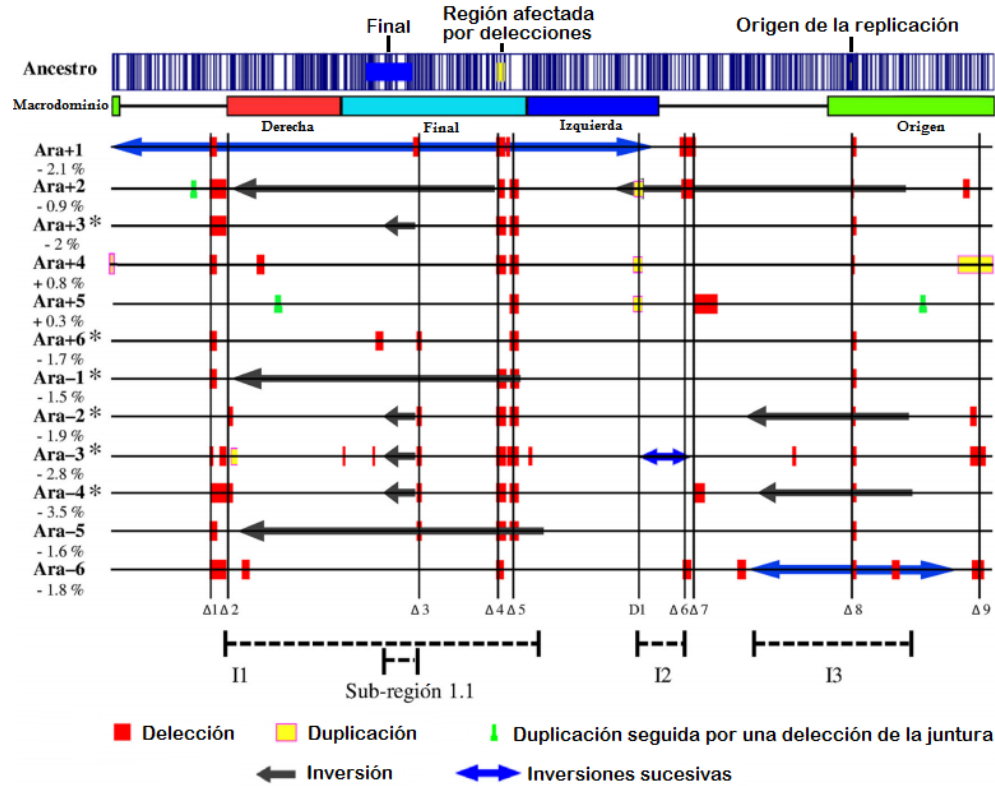


Figura 2.1: [8] Reajustes de gran escala en cromosomas de clones de muestras de cada una de las 12 poblaciones de *E. Coli* (Ara-1-Ara-6, Ara+1-Ara+6) del EELP, que evolucionaron por 40 000 generaciones. El asterisco marca los clones que evolucionaron con tasas de mutación superiores a las vistas en su antepasado. El valor de porcentaje mostrado representa el cambio relativo del tamaño del clon respecto a su ancestro. El mapa óptico de la cadena ancestral es mostrado en la parte superior, en donde se señalan las localizaciones del origen y el final de la replicación, junto con una zona que fue afectada por deleciones en 10 de los clones. Los dominios cromosomales se indican debajo del mapa. Todos los reajustes se muestran de manera relativa al genoma ancestral usando el código de colores mostrado debajo de la figura. Las líneas verticales nombradas $\Delta 1$ - $\Delta 9$ indican regiones afectadas repetitivamente (en dos o más poblaciones) por deleciones, mientras que la línea $D1$ indica una región afectada repetitivamente por eventos de duplicación. Tres intervalos cromosómicos, mostrados como I1-I3, y la subregión (1.1) sin I1 fueron afectados repetidamente por inversiones.

dientemente, constituye una evidencia muy fuerte del carácter acumulativo de las mutaciones y, de cierta manera, sugiere tener en cuenta el número total de mutaciones en cada generación.

2.2 Las mutaciones como trayectorias en el espacio de las configuraciones del ADN

Considerando una variable x que caracterice todas las posibles modificaciones del ADN y teniendo en cuenta la acumulabilidad de las mutaciones, podemos analizar su evolución temporal en las células. En el proceso de replicación, representando el parentesco de las células por líneas genealógicas, se determinan trayectorias desde la o las, células iniciales hasta las que sobreviven al final. Estas trayectorias son análogas a las definidas en [13] y [14]. La idea de trayectorias en un proceso evolutivo celular significa que existen cadenas de Markov de mutaciones [15], donde los cambios en el ADN de una célula, medidos por x , en el paso $i + 1$ están dados por los cambios en el paso anterior i más una modificación adicional δ :

$$x_{i+1} = x_i + \delta \quad (2.1)$$

El parámetro δ representa las mutaciones en el paso $i + 1$ y no es el cambio producido por factores endógenos o externos, sino el cambio resultante después de actuar los mecanismos de reparación.

2.3 Midiendo los cambios en el ADN

Es difícil englobar con una variable todos los tipos de variaciones que ocurren en el ADN de manera efectiva. Si pensamos en las mutaciones puntuales, una forma muy conveniente de medir dichos cambios es definiendo una caminata sobre el ADN, la cual se emplea en [16] para describir el propio paisaje fractal de la molécula. Este método también pudiera ser usado para el resto de las mutaciones. Podemos utilizar una variante similar a la de ellos. Primero, definimos una variable auxiliar en el sitio α de la molécula: $u_\alpha(A) = 1/8$, $u_\alpha(G) = 3/8$, $u_\alpha(C) = -3/8$ y $u_\alpha(T) = -1/8$. Luego, una caminata a lo largo del ADN queda definida de la siguiente manera:

$$y(l) = \sum_{\alpha=1}^l u_\alpha \quad (2.2)$$

Como función de l , la variable y describe un perfil de la molécula de ADN. En [17] caracterizan este perfil a través de las fluctuaciones medias, descritas cuantitativamente por la desviación cuadrática media: $F(l) = \sqrt{\langle \Delta y^2(l) \rangle - \langle \Delta y(l) \rangle^2}$, la cual está dada en función de la cantidad $\Delta y(l)$, definida como $\Delta y(l) = y(l + l_0) - y(l_0)$. La media se calcula por todas las posibles longitudes l_0 . Ellos encontraron una diferencia sustancial de comportamiento entre la región del ADN que codifica y la que no, en genes de células eucariotas. En la zona codificante encontraron que los nucleótidos están poco correlacionados entre sí. Este resultado es típico

de procesos no correlacionados o de correlación de corto alcance, donde se puede definir una longitud característica de correlación, como se espera de la distribución normal del movimiento browniano. La función $F(l)$, la cual define el radio browniano, sigue una ley $l^{1/2}$ en estos casos [17]. A veces, la zona no codificante, en contraste, exhibe correlaciones de largo alcance (libre de escala) cuya ley, l^a , presenta coeficientes distintos: $a \neq 0.5$.

A diferencia de [17], donde sólo se estudiaba la forma del ADN mediante la variable $y(l)$, nosotros también estamos interesados en su evolución temporal, acorde con lo expuesto en la sección anterior. Sus modificaciones pueden ser medidas como: $y(l) - y_0(l)$, donde y corresponde al ADN mutado y y_0 a la configuración inicial. Para caracterizar al gran número de componentes de y (5×10^9 bases) la estrategia puede ser utilizar variables que midan los cambios globales o distancias a la función original:

$$x(L) = \sum_{\alpha=1}^L (u'_\alpha - u_\alpha), \quad (2.3)$$

$$x^{(1)}(L) = \sum_{\alpha=1}^L (u'_\alpha - u_\alpha), \quad (2.4)$$

$x^{(2)}$ (el segundo momento), la entropía de Shannon [18], etc. L es la longitud de la molécula.

Tomando la primera variante por ejemplo, una sustitución de citosina (C) por guanina (G) en algún punto se corresponderá con un valor $x(L) = 3/4$, mientras que todos los reemplazamientos puntuales producen cambios en promedio de $5/12$. En casos de intercambios de varias bases, existen reconfiguraciones que producen los mismos valores de $x(L)$, pero podemos diferenciarlos llevando el número de bases cambiadas como variable adicional. Aún así, son evidentes los grandes problemas que presentan estas propuestas para describir todos los fenómenos de las mutaciones.

La razón de que exista una diferencia de comportamiento entre las dos zonas del ADN, está dada por el hecho de que mutaciones más dañinas en la zona de codificación afectan la transcripción de proteínas vitales, por tanto, o destruyen la célula o se corrige el error, en cualquier caso no se observan con la misma frecuencia.

La caminata aleatoria tiene serios problemas para medir los cambios de más de una base en el ADN, por ejemplo; si se eliminan, se insertan o se trasladan segmentos con bases al azar, el simple hecho de introducir cambios no modifica la correlación. Sólo en caso de inserciones de segmentos con bases correlacionadas la cambiaría, las deleciones y las translocaciones nunca lo harían. Sin embargo, de los resultados de [17] se pueden inferir varias cosas. Primero, que las mutaciones no se manifiestan de la misma forma en las zonas codificantes y no codificantes, si no tendrían perfiles semejantes. Segundo, dado que la caminata aleatoria resuelve bien las mutaciones puntuales, entonces el movimiento browniano debe ser una buena descripción de las mismas, porque reproduce su carácter local. Tercero, debe existir otra componente δ_{SL} , que caracterice a las mutaciones de mayor tamaño, que no se rigen por el movimiento browniano, y debe ser libre de escala. La combinación del movimiento browniano y los saltos de largo alcance es característica de los vuelos de Levy. Por lo que, a pesar de los inconvenientes que aparecen

al intentar medir los cambios en el ADN, pensamos que la evolución de las mutaciones debe regirse por un proceso de Levy. De ellos hablaremos más adelante.

Los resultados de [17] también motivaron al desarrollado de un modelo de vuelos de Levy generalizados para la secuencia de bases del ADN propuesto en [19].

2.4 Trayectorias de Levy

Un vuelo de Levy es un tipo de paseo aleatorio en el cual los incrementos son distribuidos de acuerdo a una distribución de probabilidad de cola pesada. Específicamente, la distribución usada es una ley potencial de la forma $y = x^{-a}$ donde $1 < a < 3$ [20]. El escalamiento en forma de ley de potencias de las longitudes de pasos, da a los vuelos de Levy una propiedad de escala invariante, es decir, tienen una varianza infinita. Esta característica es propia de un fractal [20].

Luego de discutir temas referentes a la medición de los cambios en el ADN en la sección anterior, podemos considerar, por cuestión de simplicidad, una única variable unidimensional $x_L(t)$, donde L es el tamaño de la cadena de ADN. El tiempo, por otro lado, se representa mejor por el número de generaciones a lo largo de un linaje celular, medido desde el ancestro común. En una población en evolución, el patrón dibujado por el conjunto de variables $\{x_L(t)\}$, una para cada célula, resulta la distribución de probabilidad. Para generar la distribución en nuestro modelo, partimos de una cadena de Markov con el siguiente incremento:

$$\delta = \delta_B + \delta_{SL}, \quad (2.5)$$

donde δ_B es la componente browniana. La otra componente no local se caracteriza por eventos raros de probabilidad total $p \ll 1$ y densidad de probabilidad proporcional a $1/\delta_{SL}^\nu$, con $1 < \nu < 3$. Más adelante estimaremos el exponente. Notemos que para la descripción de los saltos largos se requieren variables adicionales, por ejemplo el largo L de la cadena, el cual cambia después de una inserción o una delección de un fragmento de ADN. Para la probabilidad de saltos largos usamos el ansatz $p = p_{SL}\pi(l)$, donde p_{SL} es el ritmo con que se producen (eventos/generaciones) y $\pi(l)$ es la probabilidad normalizada de un evento que involucra un segmento de longitud $l \geq 1$. Al separar la parte temporal de la probabilidad de saltos largos, asumimos que los eventos se encuentran uniformemente distribuidos en el tiempo. De acuerdo a los vuelos de Levy: $\pi(l) = (\nu - 1)/l^\nu$, donde $1 < \nu < 3$.

Pudiéramos preguntarnos por qué los vuelos de Levy deberían describir las mutaciones. Puede haber un argumento general en favor de este modelo. En el EELP, donde el tamaño de la población es controlado, la evolución biológica puede verse como un problema de optimización. El *fitness* medio de la población es la función a maximizar. Las mutaciones proveen un mecanismo para buscar extremos en el espacio de las configuraciones, mientras que la selección natural escoge las mejores representaciones de la población. Una búsqueda local, como las mutaciones puntuales, pudieran atrapar las trayectorias de mutaciones alrededor de un máximo local, visto en el paisaje del *fitness* como función de la configuración. Un algoritmo de búsqueda más optimizado deberá incluir saltos largos de cualquier tamaño, como una distribución libre de

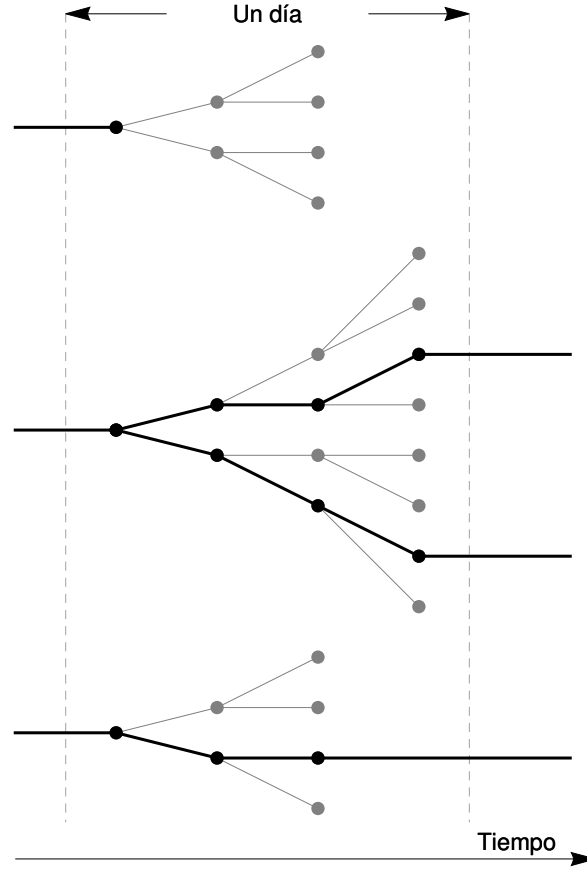


Figura 2.2: Representación esquemática de la filogenia de la evolución de las bacterias durante un día en el EELP. Se han dibujado solo 2-3 divisiones celulares, cuando en el experimento se suceden 6-7.

escala propia de los vuelos de Levy. Esta idea ha sido implementada en técnicas de optimización computacional [21].

2.5 Datos sobre mutaciones puntuales en el EELP

Un día de evolución en el EELP se representa esquemáticamente en la Fig (2.2) por trayectorias de filogenia. Usualmente los linajes con mutaciones neutras o deletéreas son truncados, mientras que las mutaciones beneficiosas les confieren ventajas evolutivas a los clones y por tanto, tienen mayor probabilidad de continuar. Una vez que aparecen, las mutaciones beneficiosas se fijan en más del 50% de la población después de un tiempo de dominancia. Hablando sin mucho rigor, si P_b es la tasa de mutaciones beneficiosas en la población y τ_f el tiempo necesario para que se fije una, entonces la cantidad de mutaciones fijadas en un tiempo t será aproximadamente $t/(\tau_b + \tau_f)$, donde $\tau_b = 1/P_b$. En la Fig (2.3) aparecen datos de mutaciones puntuales que fueron

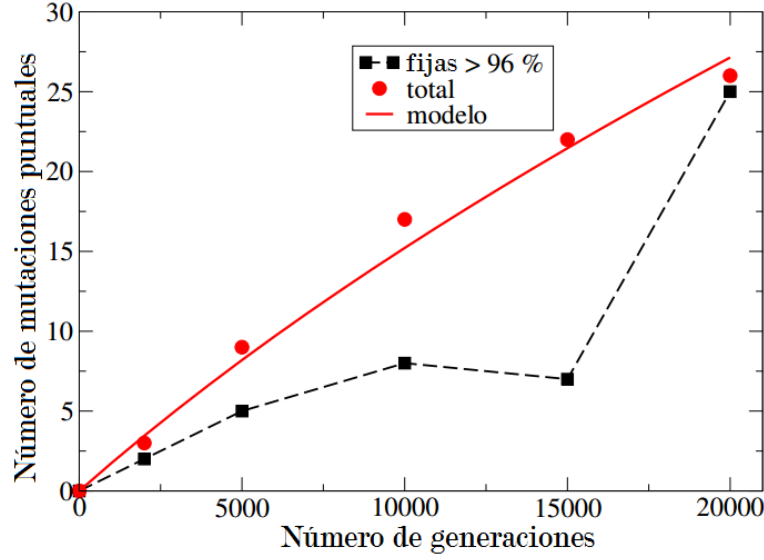


Figura 2.3: Cantidad de mutaciones puntuales como función del tiempo (número de generaciones) en la población Ara-1 del EELP [6]. Están incluidos en la figura los datos desde la generación 0 (cadena ancestral, tomada como referencia) hasta la 20 000.

tomados de [6]. En ella se muestran los valores medidos en las generaciones 2 000, 5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 30 000, y 40 000. Los otros dos puntos restantes no se incluyeron porque la aparición del fenotipo mutante en la generación 27 000 hace que la frecuencia de mutaciones aumente en 100 veces.

El experimento permite determinar frecuencias de mutaciones puntuales superiores al 4% en la población. Los autores reportan mutaciones “fijas”, lo que significa que sus frecuencias f , son mayores que el 96%, como también las mutaciones con: $4\% < f < 96\%$. Los datos llamados “fijas” en la figura muestran un incremento lineal para tiempos pequeños con pendiente 1.0×10^{-3} mutaciones/generación, lo cual brinda una estimación de P_b . Por otro lado, los datos llamados “total” son nuestras estimaciones para el número de mutaciones que se pueden detectar en un clon en total, no importa cuál sea. La pendiente en el incremento lineal inicial es un poco mayor: cerca de 1.8×10^{-3} mutaciones/generación. Debemos indicar, una vez más, que estos números son para la población completa. La tasa de mutaciones beneficiosas en un solo linaje es $p_b = P_b/N_{cel} \approx 0.8 \times 10^{-3}/(5 \times 10^6) \approx 3 \times 10^{-10}$ mutaciones/generación. Notemos que en el experimento el número de linajes de células y el tamaño del genoma son aproximadamente el mismo (5×10^6), lo que a veces puede traer confusión. Notemos también que el número total de mutaciones muestra una dependencia sublineal para largos tiempos. Esto es una consecuencia del hecho de que τ_f usualmente se incrementa cuando se añade una nueva mutación beneficiosa sobre las existentes, fenómeno conocido como epistasis. Para ajustar los datos en la figura usamos la dependencia del modelo propuesto en [3]: $2s(\sqrt{1 + aN_{gen}} - 1)/a$, donde s es la pendiente en $N_{gen} = 0$ y a es un parámetro.

2.6 Datos sobre mutaciones no locales en el EELP

En la Ref. [8] se proveen datos de reajustes cromosómicos grandes. De acuerdo a las limitaciones del experimento, los autores no pueden detectar reajustes menores que 5 kilo pares de bases (Kpb). Por otro lado, ellos solo pueden hacer mediciones en clones, que son representativos de una población, los cuales pueden exhibir grandes desviaciones de los valores medios.

El primer grupo de resultados involucran una secuencia temporal de clones de la población Ara-1, como en la sección anterior. Esto es, muestras en las generaciones 2 000, 5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 30 000, 40 000 y 50 000. Recordemos la parte espacial $\pi(l)$ de nuestro ansatz para la probabilidad de saltos largos. Nosotros no distinguimos entre los diferentes tipos de reajustes: delecciones, inserciones, translocaciones e inversiones.

La Fig (2.4) de arriba muestra los números de eventos detectados como función del tiempo (número de generaciones). La mayoría de los reajustes parece que se fijan, en el sentido de son detectados también en tiempos posteriores. Para ajustar los datos usamos la misma función que para las mutaciones puntuales: $2s(\sqrt{1 + aN_{gen}} - 1)/a$. A partir de la pendiente obtuvimos una estimación aproximada para la tasa de cambios beneficiosos en la población: $P_{bSL} \approx 5 \times 10^{-4}$ cambios/generación. Para un solo linaje de células, $p_{bSL} \approx 10^{-10}$ cambios/generación.

La Fig (2.4) de abajo, por otro lado, refleja la estadística del tamaño. Usamos una gráfica log-log con el tamaño l en el eje de las abscisas y el número de reajustes con tamaños mayores o iguales a l en el de las ordenadas. De acuerdo con nuestro ansatz, este número es igual a:

$$C(\nu - 1) \int_l^\infty \frac{dx}{x^\nu} = \frac{C}{l^{\nu-1}} \quad (2.6)$$

donde C es una constante de normalización. Notemos que cuando un cambio aparece en un tiempo dado y se fija, nosotros no lo contamos como un evento diferente en un tiempo posterior.

Los datos de la Fig (2.4) se ajustan bastante bien por la función $C/l^{\nu-1}$, con $\nu = 1.42$. Más abajo consideraremos más datos con una mejor estadística.

El segundo grupo de datos proviene de clones cosechados de las 12 poblaciones que evolucionan independientemente en el experimento, muestreados en la generación 40 000. Existen 110 reajustes grandes en dichos clones. Los resultados, mostrados en la Fig (2.5), son muy bien fiteados por la dependencia $C/l^{\nu-1}$, con $\nu = 1.49$, sugiriendo un valor límite del exponente $\nu = 3/2$. La pendiente cambia para $l < 5$ Kpb porque el experimento no puede detectar todos los cambios que ocurren con esos valores de l , como se mencionó anteriormente.

En resumen, en las secciones 2.5 y 2.6 hemos mostrado que las mutaciones en el EELP pueden describirse como trayectorias de Levy. También hemos determinado las frecuencias de mutaciones puntuales y no locales, así como el exponente de Levy, ν .

2.7 Descripción del *fitness* en el EELP

Para definir el parámetro de *fitness*, seguiremos un esquema parecido al de la Ref [22]. En el caso del EELP, una población inicial consiste en individuos con genotipos z_0 (cepa ancestral de *E. Coli*) y las réplicas siempre tienen el mismo genotipo que sus padres (reproducción por

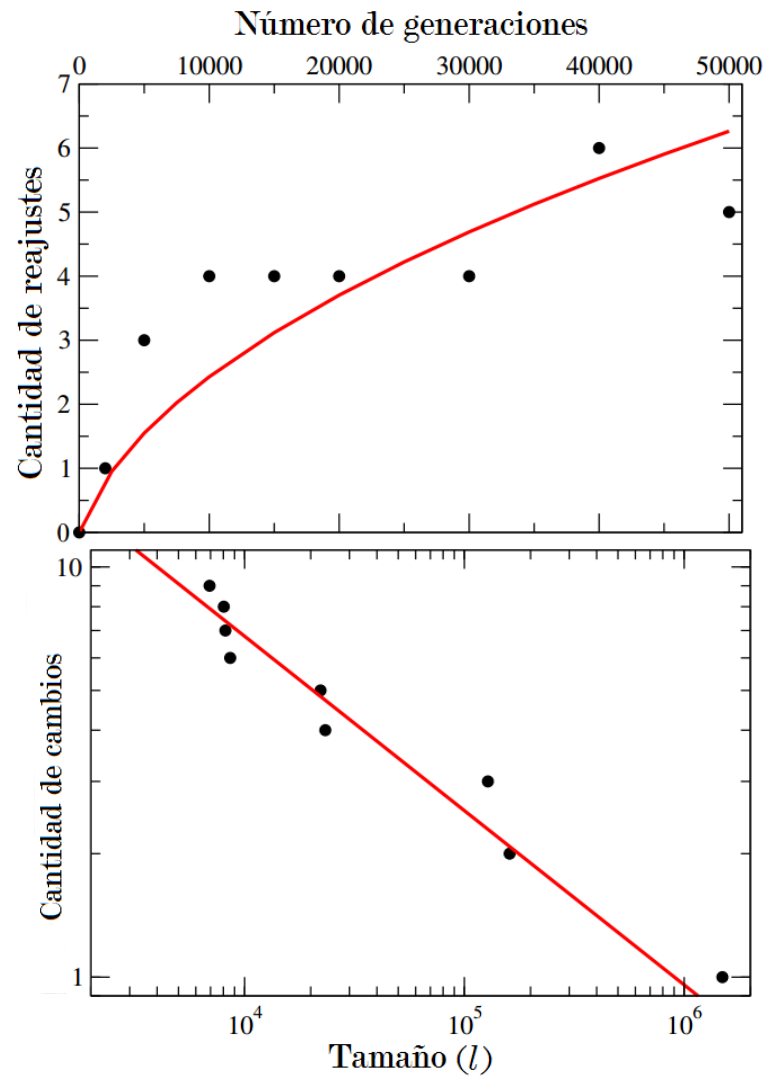


Figura 2.4: Arriba: Número de reajustes cromosómicos grandes (mayores que 5 Kpb) en clones de la población Ara-1 como función del tiempo (número de generaciones). Abajo: Log-log plot de la distribución del tamaño de los eventos (ver explicación detallada en el texto).

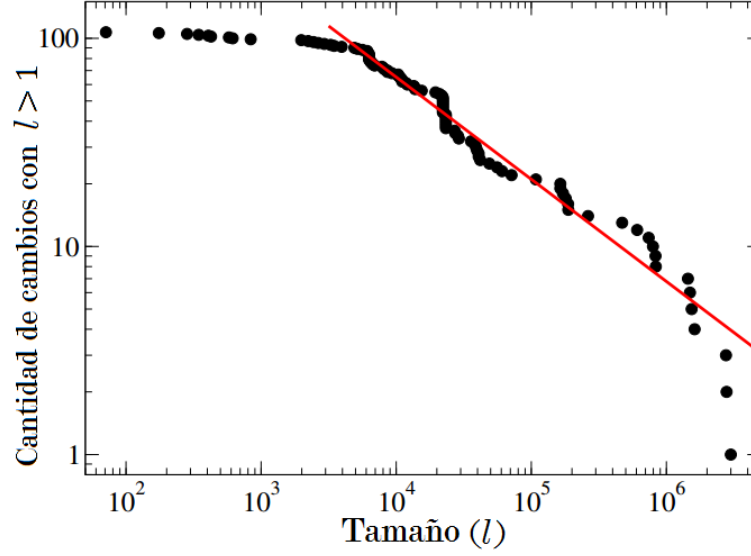


Figura 2.5: Log-log plot de la distribución del tamaño de grandes reajustes en clones obtenidos de las 12 poblaciones que evolucionan independientemente en el EELP, muestreados en la generación 40 000. La línea es un ajuste con $\nu = 1.49$.

mitosis), salvo en caso de mutaciones, donde se producen genotipos z_i con algunas variaciones. Asumamos que luego de cierta cantidad de replicaciones existe una distribución de genotipos en la población. Si del tipo z_i , existen $N(z_i)$ individuos, los cuales sobreviven con probabilidad $l(z_i)$ y dan lugar a $m(z_i)$ réplicas, entonces la cantidad de individuos nuevos que se obtienen a partir de cada tipo en la siguiente generación será:

$$N'(z_i) = l(z_i)m(z_i)N(z_i) \equiv W(z_i)N(z_i) \quad (2.7)$$

Notemos que el factor W determina las frecuencias relativas de los genotipos y por tanto, constituye una completa descripción del *fitness*. Visto de esa forma, la competencia entre los genotipos estará determinada por la razón entre sus *fitness*, por tanto, podemos normalizar el *fitness* al de uno de los genotipos, digamos z_0 :

$$N'(z_i) = w(z_i)N(z_i), \quad (2.8)$$

donde $w(z_i) = W(z_i)/W(z_0)$ y $w(z_0) = 1$

El número total de individuos de la siguiente generación será exactamente:

$$N' = N \sum_i w(z_i)f(z_i), \quad (2.9)$$

donde N es la cantidad de individuos en la generación anterior y $f(z_i)$ la frecuencia relativa de cada genotipo en la generación anterior ($f(z_i) = N(z_i)/N$). Como las mutaciones son eventos poco probables, sólo una pequeña fracción del total de los nuevos individuos tendrán genotipos

diferentes. Notemos que la aparición de nuevos genotipos en un linaje estará determinada por la supervivencia del individuo de la generación anterior a partir del cual se genera, o sea, se rige por el *fitness* de su antepasado.

Si realizamos replicas sucesivas de la población a partir de la ecuación (2.8), obtendremos una aproximación de la cantidad de individuos en la generación t :

$$N^t(z_i) = w(z_i)^t N_0(z_i) \quad (2.10)$$

En una situación hipotética donde existe un genotipo mayoritario en la población, como al inicio del EELP, la frecuencia del mismo será prácticamente la unidad y la cantidad de individuos con ese genotipo en la siguiente generación no tendrá cambios apreciables ($N'(z_0) \approx N(z_0)$). Analicemos ahora un genotipo singular z_x de la población, pobremente representado por un pequeño número de individuos. En el caso extremo de sólo existir un individuo con ese genotipo, el número de individuos con dicho genotipo en las generaciones siguientes estará determinado únicamente por su *fitness* (ecuación (2.10) con $N_0 = 1$). Así, un individuo con una mutación beneficiosa que elevó su *fitness* de 1 a 1.1 se reproducirá 1.1 veces más rápido y en algún momento se hará mayoritario.

En el EELP se controla la cantidad de individuos de una población, manteniéndose un valor de 5×10^6 linajes celulares constante en el tiempo. Si tenemos esto en cuenta en nuestro ejemplo anterior, un estimado sencillo de la cantidad de generaciones o el tiempo de dominancia, t_d , necesario para que un cierto genotipo con *fitness* w_1 se haga mayoritario frente a otro de *fitness* $w_2 < w_1$ es:

$$(w_1/w_2)^{t_d} = N_f, \quad (2.11)$$

donde N_f es una fracción de la población, por ejemplo la mitad. Cuando existen varios genotipos compitiendo entre sí, la dominancia del de mayor *fitness* no es tan trivial: se alcanza cuando la cantidad de individuos con ese genotipo supere a la del resto. La fracción de la población que representa dicha condición depende de los valores de *fitness* de cada genotipo en la competencia, este fenómeno es conocido como interferencia clonal.

2.8 Simulando las mutaciones + la selección natural en el EELP

Con el objetivo de comprobar nuestras hipótesis sobre las mutaciones, simularemos la dinámica del EELP, representada en la Fig (2.2). Como explicamos en el Capítulo 1, en el experimento se parte de un cultivo de 5×10^6 bacterias, cada bacteria se reproduce durante 6 o 7 generaciones en promedio alcanzándose 100 veces la cantidad inicial. De las 500 millones de bacterias resultantes en un día de expansión clonal, se escoge entonces el 1%, obteniéndose la cantidad inicial. Como a lo largo del experimento el número de linajes celulares permanece constante e igual al tamaño inicial del cultivo, por una cuestión de costo computacional, en la simulación nos restringimos a describir una duplicación de las 5 millones de trayectorias seguidas en el EELP.

Estamos interesados en la descripción temporal de las mutaciones, por lo que encontramos conveniente seguir la evolución del *fitness* de cada una de las trayectorias. Los primeros parámetros a tener en cuenta son las probabilidades por célula de que aparezca una mutación y de que esta sea beneficiosa. Sus valores numéricos para la población Ara-1 fueron estimados previamente en las secciones anteriores a partir de los datos del experimento. p_{mut} indica cuándo hay mutación y p_b indica cuáles de ellas son beneficiosas. Cuando una célula experimenta una mutación beneficiosa se produce un incremento de su *fitness*. Otros casos de mutaciones son las neutrales, las cuales a pesar de modificar al ADN, no producen ningún efecto sobre el *fitness*. La última posibilidad de mutaciones es que sean perjudiciales, que simulamos con la misma probabilidad de las neutrales y disminuye el *fitness* hasta en un 70%, este parámetro es arbitrario en principio, pero constituye un valor de corte a partir del cual consideramos despreciable la probabilidad de que una célula con un *fitness* tan reducido sobreviva durante 7 generaciones (un día) y logre ser detectada en el EELP.

Para incrementar el *fitness* en caso de mutación beneficiosa utilizamos el modelo descrito en [3], donde la ventaja s de la mutación se distribuye exponencialmente con densidad de probabilidad $\alpha e^{-\alpha s}$. La ventaja se define a partir de los valores de *fitness* antes y después de la mutación como: $w' = w(1 + s)$. El parámetro α de la distribución también cambia en el tiempo: $\alpha' = \alpha(1 + gs)$ (sólo en caso de mutación beneficiosa), donde g se ajusta para cada población y vale $g = 4.035$ para la población Ara-1 [3].

Mencionamos que para simular la selección natural no podemos hacer una expansión clonal de 5 a 500 millones de células, como en el experimento, y después escoger aleatoriamente 5 millones. Como debemos mantener arreglos de *fitness*, número de mutaciones, etc. las dimensiones se hacen muy grandes.

En vez de eso, hacemos una sola duplicación y escogemos la mitad de las células. El algoritmo en cuestión es así:

- El mayor *fitness* se toma como referencia, w_{max} .
- De cada clon se hacen dos copias y se determina si existen mutaciones con probabilidad condicional $p_{mut} = 10^{-3}$ y, de ellas, si son beneficiosas, con probabilidad $p_b = 10^{-6}$. Estos valores son dictados por el experimento.
- La permanencia, o no de las copias que provienen de w_{max} se hace aleatoriamente con probabilidad $1/2$. Para el resto de los clones la probabilidad es $w/(2w_{max})$.

A veces, después de este procedimiento no se han completado los 5 millones de células, faltan unos miles. Ellas se escogen aleatoriamente ya que, como son tan pocas, las frecuencias relativas no tienen un gran peso.

En la Fig (2.6) se muestra la evolución temporal del *fitness* promedio de la población a lo largo de 20 000 generaciones, obtenida de la simulación. El comportamiento es similar al de la Ref.[3]. También se reproduce el comportamiento de la evolución temporal de la cantidad de mutaciones, análogo a la Fig (2.3) y mostrado en la Fig (2.7). En las gráficas, las generaciones donde aparecen mutaciones beneficiosas están marcadas. Los escalones de

ambas gráficas indican que cierta mutación beneficiosa se fijó en la población y elevó el *fitness* medio abruptamente. Otras de ellas fracasan en la competencia por sobrevivir, sin embargo, constituyen fuentes de variabilidad genotípica.

También podemos analizar el tiempo que necesita una mutación beneficiosa para fijarse en la población. Resulta que mientras más beneficiosas sean, es decir, mayor *fitness* tenga la célula mutada, más rápido ésta se propagará.

En la Fig (2.8) se muestran datos recogidos en distintas generaciones de la cantidad de mutaciones producidas. Las curvas que se obtienen son consistentes con una distribución poissónica truncada: es decir, de la forma $Ne^{-\lambda}\lambda^k/k!$; donde k es variable discreta inicializada en cierto valor positivo, λ es un parámetro que resulta el valor medio de la distribución y N es una constante de normalización. A partir de la generación 10 000 ya todas las trayectorias tiene al menos 4 mutaciones, mientras que en la generación 20 000 tienen al menos 9. Contando la cantidad de escalones en la gráfica del *fitness* medio sabemos que al menos 5 de esas mutaciones son beneficiosas. Otro resultado interesante es referente a la variabilidad genotípica. Resulta que, en los primeros instantes de la simulación, la mayoría de las células tienen *fitness* unitario y existe poca variabilidad debido a que no le han dado tiempo de propagarse las mutaciones. A medida que avanza la simulación el abanico de posibilidades aumenta, lo que se traduce en un aumento del ancho de la distribución de las mutaciones (generaciones 1 000, 2 000 y 5 000). A veces el abanico se cierra instantes posteriores a la aparición de una mutación beneficiosa en un genotipo, que se vuelve dominante y extingue a la mayoría de los demás competidores (generación 10 000). Esto constituye una manifestación de la interferencia clonal. En la generación 20 000 se vuelve a ensanchar la distribución después de un período de evolución sin que se fije alguna mutación beneficiosa.

Por otro lado, el perfil de frecuencias de todos los genotipos obtenidos en varios instantes de la simulación son mostrados en la Fig (2.9). Se escogieron tres situaciones diferentes que se pueden dar y que ocurrieron en el perfil de las generaciones 2 000, 10 000 y 20 000. En la primera tenemos que la mayoría de las células tienen un *fitness* de 1, que se corresponde con el máximo valor fijado en la población. En la segunda se observan dos picos de frecuencia correspondientes a mutaciones beneficiosas en clones que compiten entre sí, la de mayor *fitness* es mayoritaria y posteriormente puede imponerse (interferencia clonal). En el tercer caso tenemos otra interferencia clonal donde el mayor *fitness* no se ha hecho mayoritario.

Algunas diferencias de nuestra simulación con respecto al experimento, son que subestimamos los máximos de *fitness* y la cantidad de mutaciones en promedio. La razón de este resultado podría ser, que la probabilidad de ocurrencia de mutaciones se estima suponiendo que, en el EELP, la mayoría de la mutaciones beneficiosas producidas se fijaban en toda la población, contrario a lo que se observa en nuestra simulación. Posiblemente, las probabilidades reales de mutaciones sean más altas y la fracción de mutaciones beneficiosas que se pierden sea también tan alta, como en la simulación.

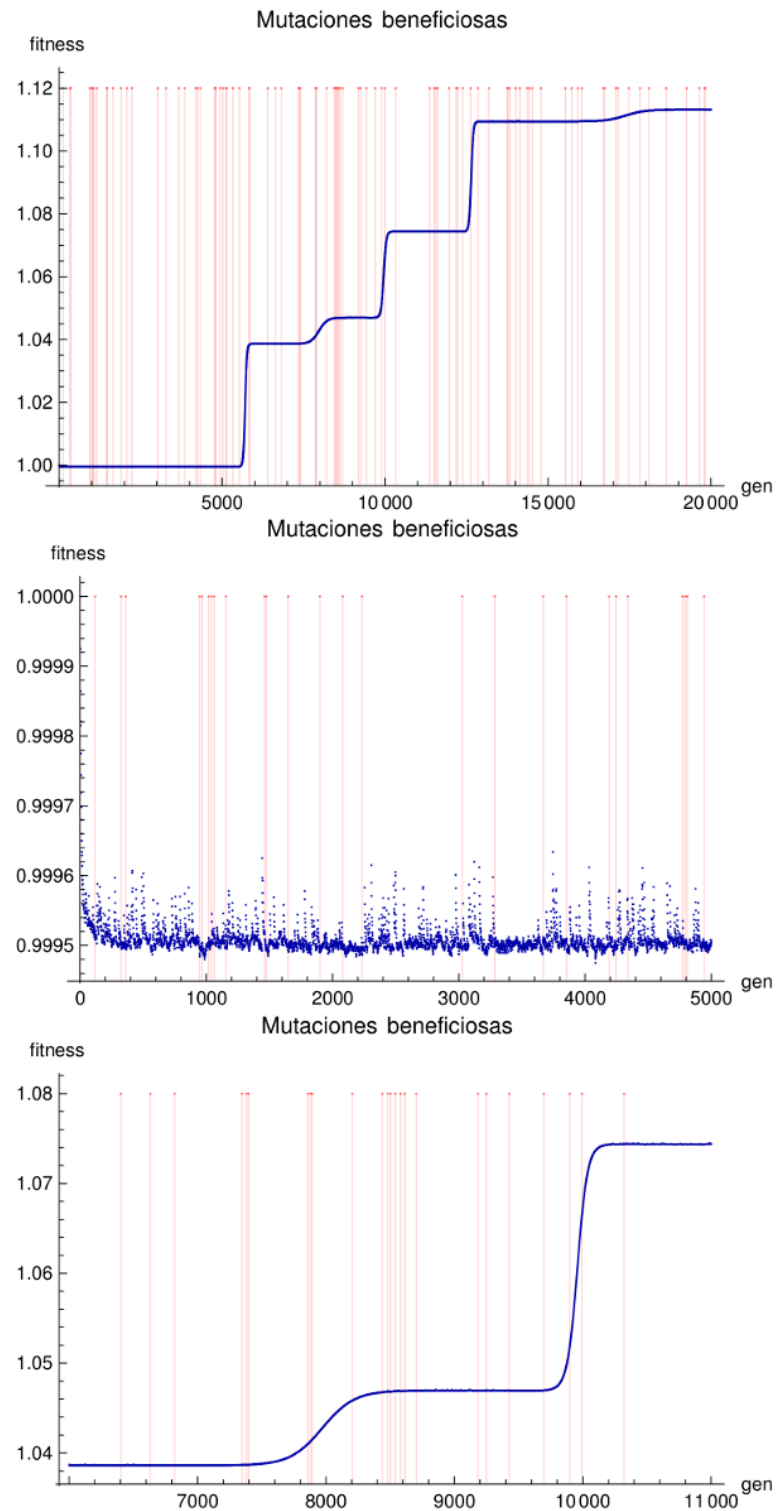


Figura 2.6: Historia del *fitness* medio en la simulación hasta 20 000 generaciones y detalles en distintas etapas. Las líneas verticales representan la aparición de mutaciones beneficiosas, la mayoría de las cuales no logra imponerse.

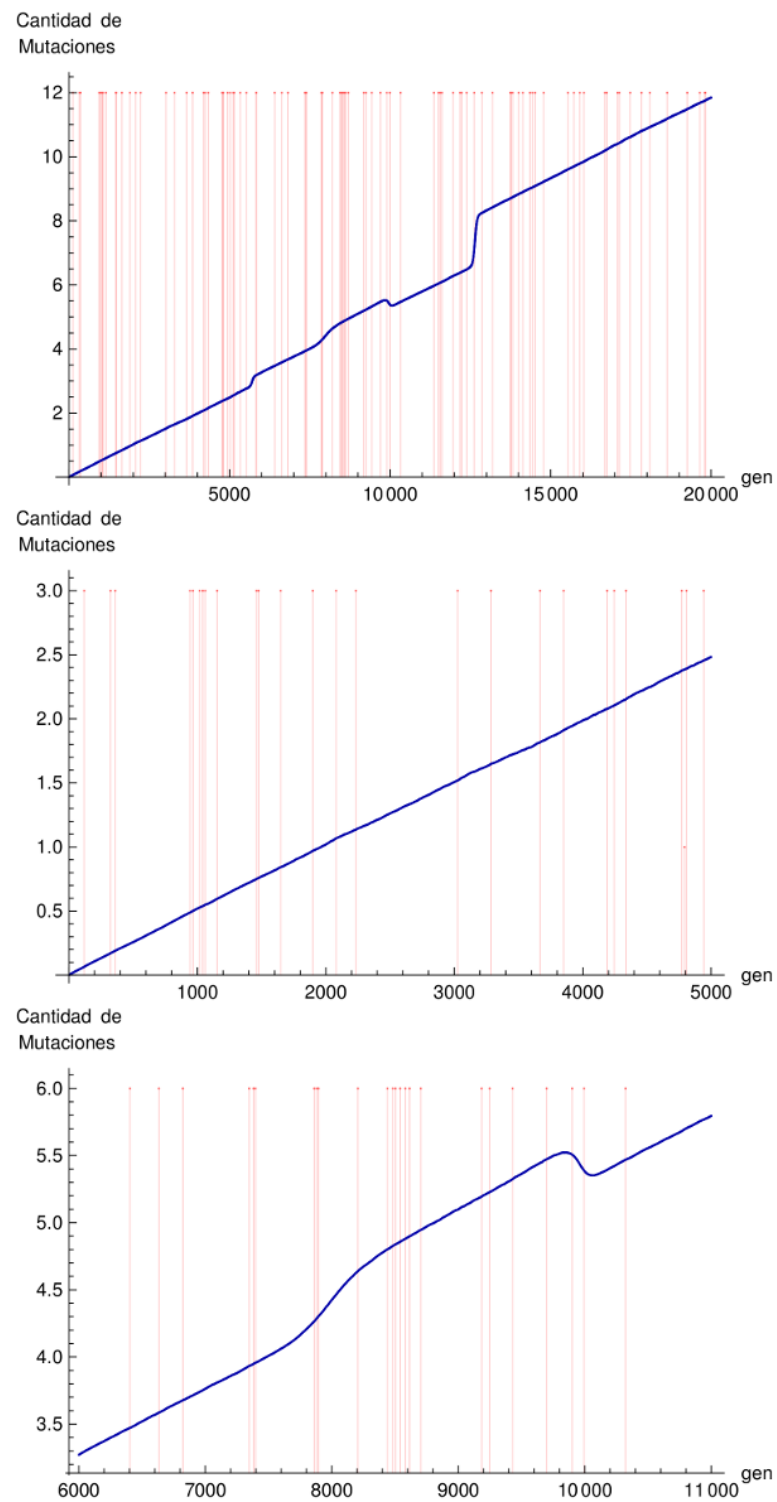


Figura 2.7: Historia de la cantidad media de mutaciones en la simulación hasta 20 000 generaciones.

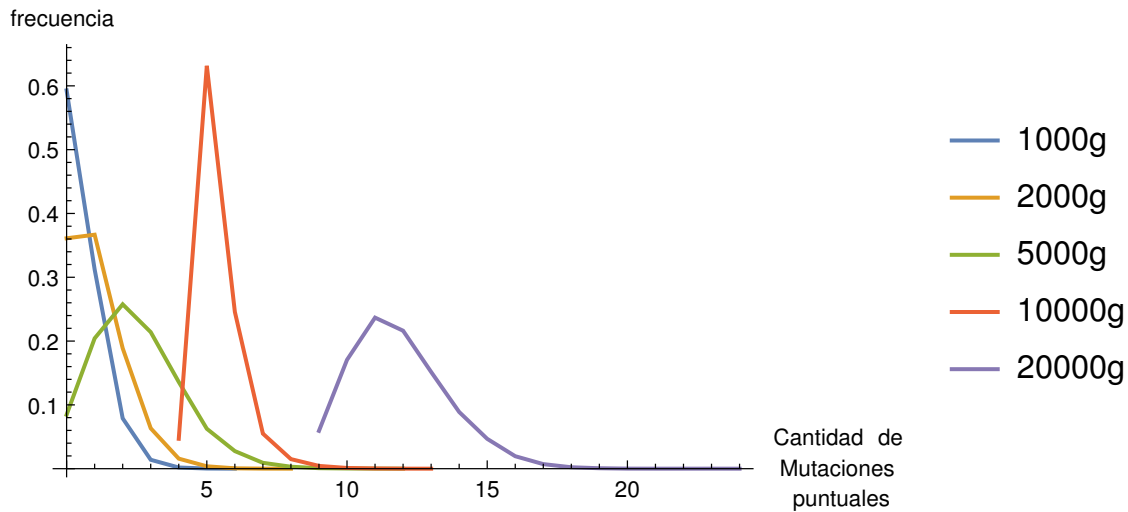


Figura 2.8: Perfiles de la cantidad media de mutaciones en distintos momentos la simulación: en las generaciones 1 000, 2 000, 5 000, 10 000 y 20 000.

2.9 Aparición del genotipo mutante en el EELP

En varias poblaciones del EELP aparece un “mutante”, es decir, un genotipo donde la frecuencia de mutaciones aumenta aproximadamente 100 veces respecto a la cepa ancestral [2]. En la Fig (2.10), tomada de la Ref [2], se muestra la frecuencia de mutaciones ante un antibiótico de las diferentes poblaciones del EELP, cuando se alcanza un número de generaciones $N_{gen} = 10000$.

Se observan 3 poblaciones donde el mutante se ha impuesto como genotipo dominante. Esto significa que su *fitness* es superior al promedio de la población, es decir, constituye un tipo especial de mutación beneficiosa que da lugar a su vez a un aumento de la tasa de mutaciones. Estudios en pacientes con fibrosis quística en los pulmones, infectados por *P. aeruginosa* [23], indican que también un genotipo mutante puede estar relacionado con la resistencia de capas bacteriales a los antibióticos.

En la Fig (2.11) mostramos los datos del EELP sobre cuando aparece el genotipo mutante [3]. Los resultados son, de alguna forma, similares a la Fig (2.3) con el número de mutaciones beneficiosas como función del tiempo. La pendiente cerca del cero nos permite apreciar una frecuencia aproximada de 5×10^{-4} para la aparición del mutante en una población. Para convertirse en mayoritario, el mutante debe sobrepasar la selección aleatoria y competir con otros clones, cuyos *fitness* aumentan con el tiempo, aumentando el tiempo de dominancia.

Dividiendo la frecuencia por el número de líneas de evolución celular (5×10^6) en el experimento, obtenemos la probabilidad de aparición del mutante por célula: $p_{mut} = 10^{-10}/cel$, aproximadamente la mitad de la probabilidad de aparición de una mutación beneficiosa.

Veamos que también pudiera existir alguna similitud con el cáncer.

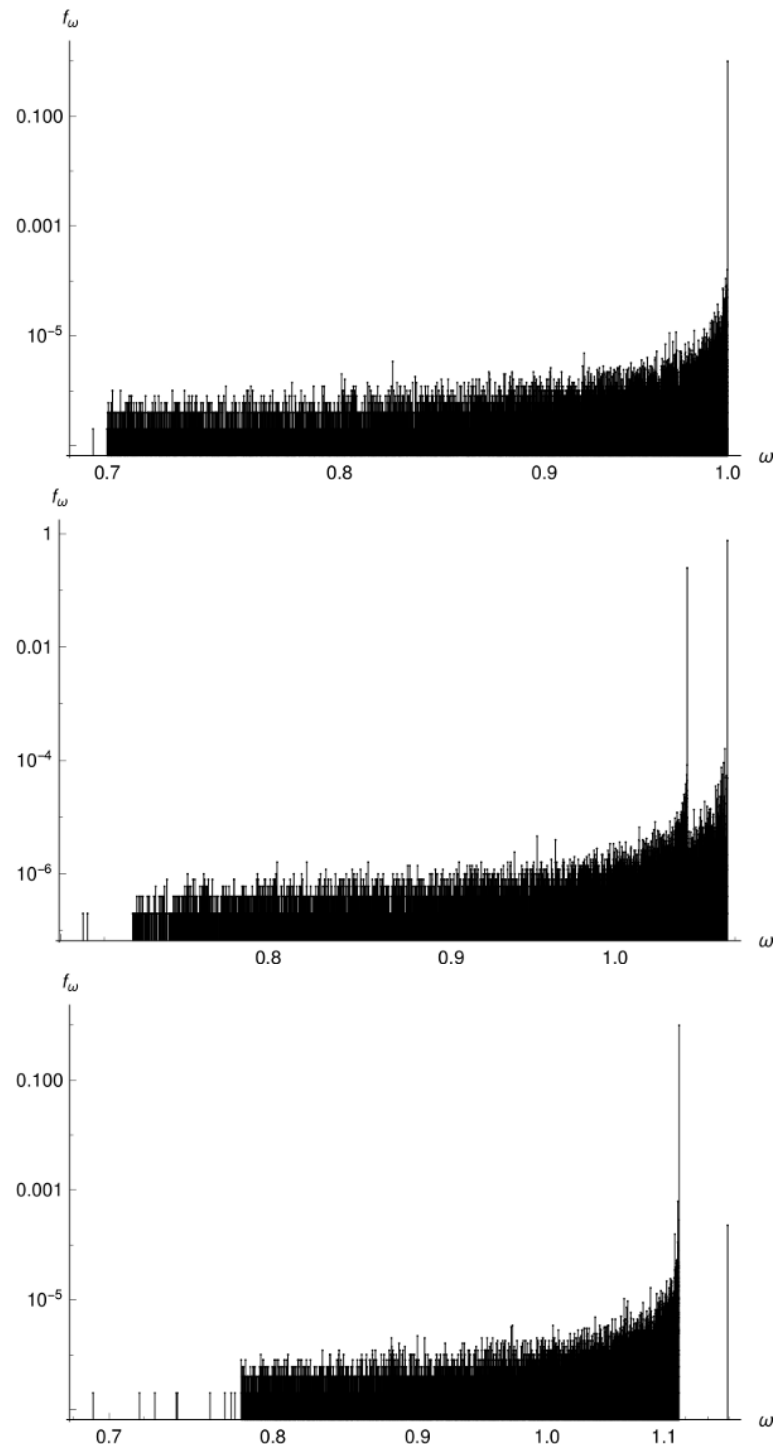


Figura 2.9: Tres tipos de situaciones que se pueden dar con el *fitness* en el EELP y la simulación, referentes a la interferencia clonal. En la figura de arriba predomina un sólo genotipo. En la figura del medio compiten dos genotipos, pero el de mayor *fitness* es el dominante. En la figura de abajo también compiten dos genotipos, pero el de mayor *fitness* no se ha interpuesto.

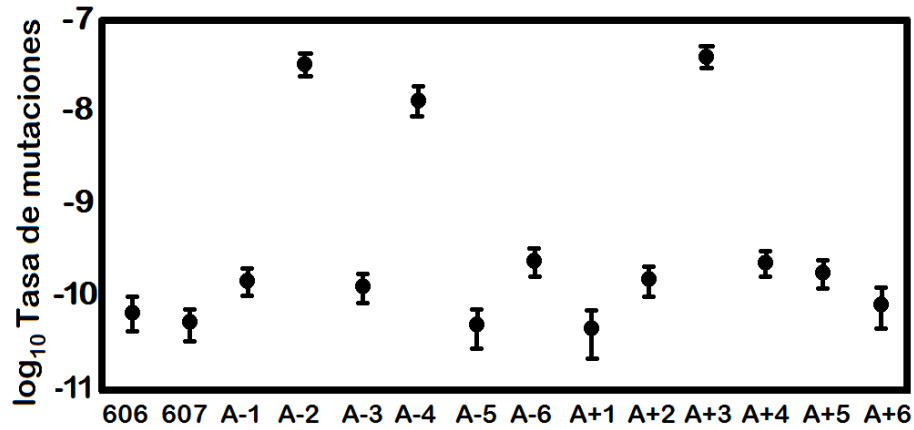


Figura 2.10: Tres de las 12 poblaciones de *E. Coli* del EELP evolucionaron a fenotipos hipermutantes después de 10 000 generaciones. Los datos muestran las tasas de mutación de las 12 poblaciones (Ara-1-Ara-6, Ara+1-Ara+6) y sus respectivos ancestros (606 y 607) al resistirse a un antibiótico. Las poblaciones hipermutantes tienen cerca de 100 veces la tasa de mutación de sus ancestros, así como de las otras líneas de evolución.

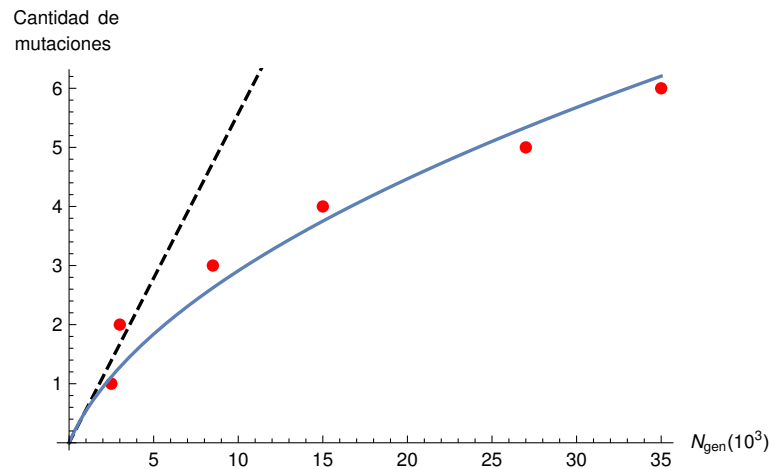


Figura 2.11: Aparición del genotipo mutante en las poblaciones del EELP. La gráfica muestra la cantidad de poblaciones en las que aparece como función del número de generaciones. La línea continua es un ajuste de los datos con el modelo dado en la Ref [3]. La pendiente cerca del cero, representada con líneas discontinuas, nos da un aproximado de su frecuencia de aparición: 5×10^{-4} mutantes/generación.

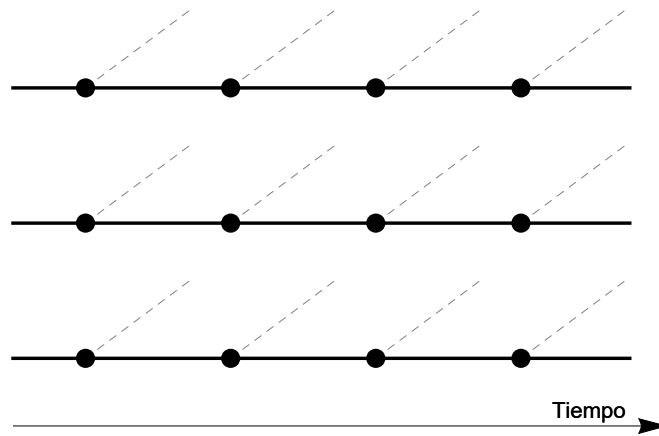


Figura 2.12: Filogenia de las células madres de los tejidos en la fase de homeostasis, las únicas capaces de acumular mutaciones. Las líneas de división celular, representadas discontinuamente, dan lugar a células especializadas de corta vida.

2.10 EELP y cáncer

Existe una gran diferencia entre la filogenesis de evolución en el EELP y en los tejidos humanos [24], que se muestra en la Fig (2.12):

La figura contiene sólo las líneas de evolución de las células madres en la fase de homeostasis. Las líneas de división celular, representadas discontinuamente, dan lugar a células especializadas de corta vida. Las líneas de células madres son las únicas que perduran durante la vida del organismo y acumulan mutaciones, por eso se piensa que son ellas las pueden dar lugar al cáncer.

La diferencia fundamental de esta figura con la Fig (2.2) es que no existe interferencia clonal (excepto en la fase de crecimiento del tejido), es decir, las líneas evolucionan independientemente. Esto pudiera ser una estrategia evolutiva para reducir la propagación de cáncer en el tejido, al igual que la división asimétrica del ADN [24], o sea que las células madres retienen el hilo ancestral del ADN al replicarse el mismo. La independencia de las líneas se refuerza a veces con la compartimentación en el tejido: una célula madre puede estar relacionada con una zona específica en el tejido, como sucede con las criptas intestinales.

Como similitud con el EELP podemos resaltar que el cáncer, en un gran porcentaje de los casos, es un genotipo mutante [24], lo que le confiere la habilidad para evadir la respuesta inmune.

En la Fig (2.13) reploteamos los datos de Tomasetti y Vogelstein [9], para un conjunto de tejidos que hemos denominado “normales”. La diferencia es que el eje de las ordenadas ahora tiene el riesgo por célula y el eje de las abcisas, mide el número de generaciones a partir de la célula madre originaria que da lugar al tejido. La dependencia lineal es asombrosa a pesar de que los puntos representan órganos tan diversos como el cerebelo, la sangre y el colon, entre otros. Muestra lo que querían los autores: que en algunos tejidos el riesgo de cáncer se conforma

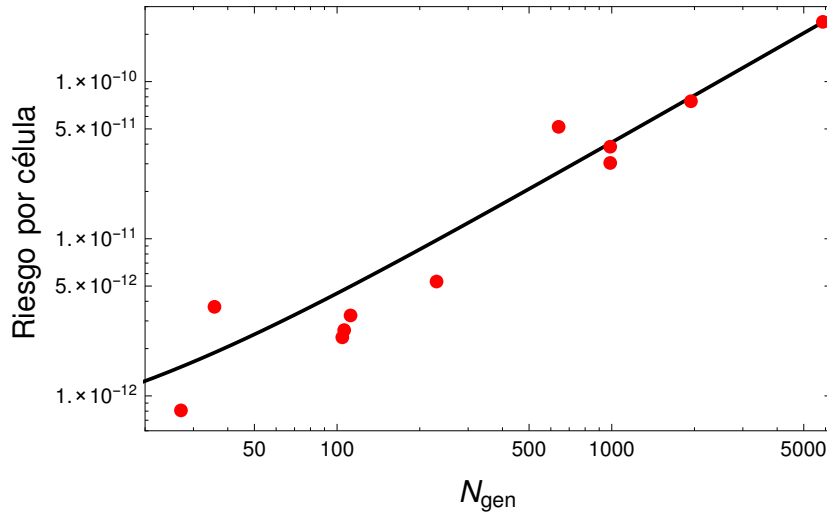


Figura 2.13: Log-Log plot de los datos de riesgo de cáncer [9] por célula en tejidos que pensamos que están poco afectados por otros factores carcinogénicos, en función del número de generaciones de células madres de cada tejido.

con la frecuencia de replicación. La dependencia del riesgo por célula con N_{gen} es lineal, con una pendiente 4×10^{-14} , cuatro órdenes menor que la probabilidad de mutación p_{mut} estimada en el EELP. Asumiendo, sin ninguna base desde luego, que células potencialmente cancerosas son generadas con frecuencia p_{mut} , resultaría que solo una de 10 000 continuaría su ruta hacia la formación del tumor. El resto sería eliminado por el sistema inmunológico.

2.11 Probabilidades de impacto de las radiaciones sobre las células madres del pulmón

A partir de los datos de la actividad del radón en la atmósfera tomados de la referencia [12], podemos ofrecer un estimado simple de la probabilidad de impacto de las partículas α con las células madres del pulmón, provenientes de la desintegración del radón que respiramos.

El tiempo de vida medio del isótopo ^{222}Rn es de 3.8 días, el cual es 100% abundante naturalmente, como se dijo con anterioridad. El ritmo de flujo de aire en los pulmones, por otro lado, es de 4 litros por minuto. Teniendo en cuenta que la capacidad pulmonar es de aproximadamente de 3.5 a 4 litros, prácticamente todo el aire de los pulmones es renovado en cada minuto. Comparando el ritmo de respiración con el tiempo de vida medio del radón, en buena aproximación, la actividad de este isótopo en los pulmones es semejante a la encontrada en el aire circundante: $40Bq/m^3$ al aire libre y $150Bq/m^3$ dentro de las casas.

Por otro lado, en el pulmón existen estructuras bronquiales llamadas alveolos, donde se almacena el aire inspirado y se realiza el intercambio gaseoso con la sangre, mediante la difusión (Fig (2.14)). La pared celular de los alveolos es una capa unicelular, típicamente de menos de

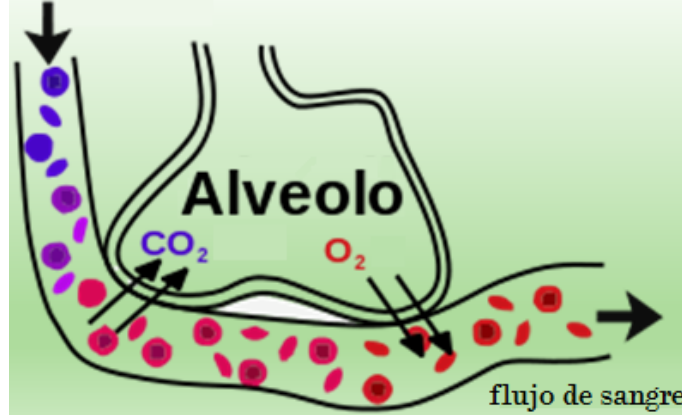


Figura 2.14: Alveolo pulmonar y microcapilar sanguíneo. La membrana del alveolo es unicelular, de ancho menor que una micra, para permitir el intercambio gaseoso. El diámetro del microcapilar es de $100\mu m$ aproximadamente.

$1\mu m$, para que se de la difusión. Los capilares que rodean a los alveolos tienen diámetros de $100\mu m$ aproximadamente.

Una pregunta interesante es cuán profundo logran penetrar las partículas α procedentes de la desintegración del radón en nuestro organismo. Un estimado simple consiste en tomar datos de la potencia de frenado (p_f) de partículas α en el agua presentes en [25], para calcular su longitud de penetración en el agua. Esta longitud no debe variar mucho en el caso de la sangre u otros tejidos, ya que su densidad es muy parecida a la del agua. La potencia de frenado depende de la energía inicial que tengan las partículas, $5.6MeV$ en la desintegración del ^{222}Rn . La potencia de frenado en este caso es de $p_f = 4.32 \times 10^{-3}g/cm^2$. El cálculo queda de la siguiente manera:

$$l = \frac{p_f}{\rho} \approx 43.2\mu m \quad (2.12)$$

donde la densidad del agua se tomó de $\rho = 1g/cm^3$. Comparando el valor de la longitud de penetración con las dimensiones de la pared celular que encuentran las partículas α al introducirse en los alveolos, podemos concluir que o bien se queda en el alveolo, o pasa a la sangre, en cualquier caso permanece en el pulmón.

Estableciendo que cada partícula α resultante de la desintegración del radón impacta en alguna de sus células y, teniendo en cuenta que la proporción de células madres que hay en los pulmones es del 0.4% (tomadas de la [9]), podemos calcular la frecuencia con que se impacta alguna célula madre, denotada F_{imp} :

$$F_{imp} = 0.004AV_p \sim 10^{-3}impactos/s \quad (2.13)$$

donde A y V son respectivamente la actividad del radón en los pulmones (tomada de $100Bq$) y su volumen($4lt$). También podemos calcular la frecuencia por célula en función de la cantidad

de generaciones de las células madres, para ello necesitamos la cantidad total de células madres ($N_{celM} = 1.2 \times 10^9$) y el tiempo que tarda en dividirse cada una: $\tau = 14.3$ años.

$$f_{imp} = F_{imp}\tau/N_{celM} \approx 4 \times 10^{-4} impactos/gen \quad (2.14)$$

Anteriormente habíamos estimado que la probabilidad de ocurrencia de una mutación en una base del ADN de una célula era de $10^{-9} - 10^{-10}$ por generación, por lo que la probabilidad de que ocurra en un segmento de longitud l será: $P_{rob} \sim 10^{-9}l$. Nos interesan las mutaciones en los sectores codificantes del ADN, específicamente de los genes p53 y Rb, que son los que se sospecha que juegan un papel importante en la génesis del cáncer. En la Ref [26] aparecen datos de la longitud de estos genes, $l = 10Kpb$ y $l = 100Kpb$ serían estimados de los tamaños de la zona codificante. La frecuencia de ocurrencia de mutaciones en estos genes sería de:

$$f_{mut} = 10^{-9} \times 100Kpb \sim 10^{-4} - 10^{-5} mutaciones/gen \quad (2.15)$$

A pesar de la simplicidad del cálculo, las frecuencias de (2.14) y (2.15) son parecidas, lo que pudiera indicar que una de las causas fundamentales de la ocurrencia de mutaciones en las células madres pulmonares sea la desintegración del radón presente en el aire que respiramos.

Capítulo 3

Conclusiones y Recomendaciones

3.1 Conclusiones

A lo largo de este trabajo se han expuesto varias ideas relacionadas con las mutaciones en linajes celulares de bacterias y tejidos humanos. Se ha hecho una extensa revisión de literatura sobre diversos tópicos, pero no en todos hemos llegado a resultados propios. Los principales resultados de la tesis son los siguientes:

1. Mostramos, a partir de datos del EELP, que las mutaciones en bacterias se pueden describir por trayectorias de Levy, que se componen por mutaciones puntuales y reordenamientos no locales del ADN. La tasa de ambos eventos se estimó en $p_{mut} \approx 10^{-10}$ mutaciones/generación, mientras que el parámetro de Levy se estimó como $\nu \approx 3/2$.

Pensamos que el resultado anterior tiene un carácter general, es decir, el modelo pudiera ser válido para las mutaciones celulares, aunque los parámetros variarían en dependencia del sistema en cuestión y de las condiciones a las que se encuentra expuesto.

Con estos resultados se ha elaborado un artículo [\[27\]](#).

2. Se diseñó y puso a punto un algoritmo para mezclar las mutaciones con la selección natural en condiciones muy similares a las del EELP. Para ello se introdujo el *fitness* de los clones. La simulación mostró que la tasa de mutaciones beneficiosas que no se fijan es muy alta (94.6%), por lo que el estimado $p_{mut} \approx 10^{-10}$ mutaciones/generación constituye una cuota inferior y el valor real en el experimento pudiera ser varias veces mayor.
3. Se determinó la distribución del número de mutaciones y del *fitness* dentro de la población de bacterias, como función del número de generaciones. A partir de ellas se observan resultados interesantes que describen fenómenos del EELP, como la interferencia clonal y la epistasia. Estos resultados están pendientes de elaborarse para publicación.
4. A partir de la distribución del *fitness* obtenemos una descripción de la variedad genotípica resultante de la competitividad de los clones. Dicha variedad pudiera ser comprobada analizando las secuencias de ADN de las poblaciones de bacterias en el EELP.

3.2 Recomendaciones

Las recomendaciones son, básicamente, continuar las líneas que han quedado pendientes:

1. En el trabajo [13], por ejemplo, se relacionó el genotipo mutante en el EELP con los reordenamientos no locales del ADN bacterial. Esto no necesariamente es así. En la referencia [23], los autores señalan a una mutación puntual en el gen *Mut* de *E. Coli* como la responsable de la aparición del genotipo mutante en algunas de las poblaciones. Lo indiscutible es que es una mutación beneficiosa que, al dar lugar a su vez a un incremento en la tasa de mutaciones, aumenta las posibilidades de hallar variantes con mayor *fitness*. Una posible línea de trabajo consiste en correr el algoritmo de competencia clonal en presencia de un mutante.
2. De forma similar, en el trabajo [14] se relacionó la aparición de cáncer con reordenamientos no locales del ADN. Esto tampoco es así necesariamente. La idea más aceptada es que su génesis es múltiple [24], diversos cambios genéticos o epigenéticos pueden originarlo. Incluso existen opiniones de que un cambio, puntual o no, en uno de los genes p53 y Rb [28] son capaces de desencadenar el tumor. Estos cambios pudieran ser debido a factores externos o intrínsecos, pero, continuando el símil con el genotipo mutante de *E. Coli*, su evolución depende de que la mutación le de cierta ventaja a la célula en condiciones de homeostasis y vigilancia inmunológica del tejido. El problema es interesante, pero en estos momentos no sabemos cómo modelarlo.
3. Otra línea de interés es seguir investigando formas de medir los cambios que se producen en el ADN, para lograr así, una comprensión más profunda de las mutaciones. En particular, sería interesante incorporar en esta descripción, el control de la expresión genética; ya que, como hemos dicho antes, juega un papel fundamental en la génesis del cáncer.
4. Hicimos una amplia revisión del riesgo de cáncer y la dosis de radiación recibida por los distintos tejidos del cuerpo humano. Los datos más elaborados que hallamos, se refieren a la población de los Estados Unidos [11] e indican al pulmón como el tejido sobre el cual la radiación tiene mayor impacto. Incluso existe un reporte detallado correlacionando especialmente el riesgo de cáncer de pulmón, en diferentes estados, con las concentraciones naturales de radón [12]. Los efectos, sin embargo, son pequeños comparados con otros agentes carcinogénicos. La radiación puede, por ejemplo, duplicar el riesgo de cáncer de pulmón, pero el hábito de fumar lo incrementa en 20 veces. De todas formas, el problema tiene gran importancia para la salud y se debería continuar.
5. Finalmente, hicimos también una revisión de la exposición de la población a distintas sustancias químicas, hallando datos muy meticulosos del Departamento de Salud de los Estados Unidos [29]. A diferencia de las radiaciones, no existe aquí un concepto análogo al de dosis equivalente, donde el efecto de las distintas sustancias pudiera compararse en una misma magnitud o parámetro. Debido al importantísimo efecto tóxico y carcinogénico que tienen muchas sustancias, se debería hacer un esfuerzo en sistematizar y caracterizar

sus efectos. Es un terreno relativamente nuevo para la investigación y con gran impacto para la salud.

Anexos

Anexo A

Datos de riesgo de cáncer en tejidos

Tipo de cáncer	Riesgo por vida	Cantidad de células* del tejido donde se origina	Cantidad de células madres* en el tejido	Cantidad de divisiones de células madres por año
leucemia mieloide aguda	0.0041	3×10^{12}	1.35×10^8	12
carcinoma basocelular	0.3	1.8×10^{11}	5.82×10^9	7.6
leucemia linfática crónica	0.0052	3×10^{12}	1.35×10^8	12
cáncer colorrectal	0.048	3×10^{10}	2×10^8	73
cáncer colorrectal con PAF	1	3×10^{10}	2×10^8	73
cáncer colorrectal con síndrome de Lynch	0.5	3×10^{10}	2×10^8	73
cáncer de duodeno	0.0003	6.8×10^8	4×10^6	24
cáncer de duodeno con PAF	0.035	6.8×10^8	4×10^6	24
cáncer de células escamosas del esófago	0.001938	3.24×10^9	8.64×10^5	17.4
cáncer de vesícula no papilar	0.0028	1.6×10^8	1.6×10^6	0.584
glioblastoma	0.00219	8.46×10^{10}	1.35×10^8	0

Tabla A.1: Datos de riesgo de incidencia de cáncer en la vida y parámetros relacionados con las células madres normales que son precursoras de esos cánceres [9]. * “Células” y “células madres” se refiere solamente a aquellas células normales del mismo tipo que las células cancerosas de ese tejido. Por ejemplo, para el cáncer colorrectal, las células y las células madres se refieren a células epiteliales, no a los estromas u otros tipos de células de colon anómalo.

carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello	0.0138	1.67×10^{10}	1.85×10^7	21.5
carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello con VPH-16	0.07935	1.67×10^{10}	1.85×10^7	21.5
hepatocarcinoma	0.0071	2.41×10^{11}	3.01×10^9	0.9125
hepatocarcinoma con hepatitis C	0.071	2.41×10^{11}	3.01×10^9	0.9125
adenocarcinoma de pulmón (no fumadores)	0.0045	4.34×10^{11}	1.22×10^9	0.07
adenocarcinoma de pulmón (fumadores)	0.081	4.34×10^{11}	1.22×10^9	0.07
meduloblastoma	0.00011	8.5×10^{10}	1.36×10^8	0
melanoma	0.0203	3.8×10^9	3.8×10^9	2.48
osteosarcoma	0.00035	1.9×10^9	4.18×10^6	0.067
osteosarcoma de los brazos	0.00004	3×10^8	6.5×10^5	0.067
osteosarcoma de la cabeza	0.0000302	3.9×10^8	8.6×10^5	0.067
osteosarcoma de las piernas	0.00022	7.2×10^8	1.59×10^6	0.067
osteosarcoma de la pelvis	0.00003	2×10^8	4.5×10^5	0.067
células germinales del ovario	0.000411	1.1×10^7	1.1×10^7	0
adenocarcinoma de células de los conductos pancreáticos	0.013589	1.672×10^{11} (ácinos)	4.18×10^9	1
carcinoma neuroendocrino pancreático	0.000194	2.95×10^9 (islote)	7.4×10^7	1
adenocarcinoma del intestino delgado	0.0007	1.7×10^{10}	1×10^8	36
células germinales de los testículos	0.0037	2.16×10^{10}	7.2×10^6	5.8
carcinoma folicular/papilar de tiroides	0.01026	10^{10}	6.5×10^7	0.087
carcinoma de tiroides medular	0.000324	10^9	6.5×10^6	0.087

Tabla A.2: Continuación de la Tabla A.1

Anexo B

Coeficientes de la dosis

B.1 Peso de la radiación

Para la descripción ...

Tipo de radiación	factor w_R
Fotones	1
Electrones y muones	1
Protones y piones cargados	2
Partículas alfa ,Fragmentos de fisión, Iones pesados	20
Neutrones	Una función continua de la energía del neutrón: $w_R(E_n)$

Tabla B.1: Factores de ponderación recomendados para la radiación.

El factor de ponderación de la radiación para los neutrones refleja su eficacia biológica relativa debida a la exposición externa. La eficacia biológica de neutrones incidentes en el cuerpo humano depende fuertemente de la energía del neutrón (Fig (B.1)).

B.2 Sensibilidad del tejido

$$w_R = \begin{cases} 2,5 + 18,2e^{-[1n(E_n)]^2/6} & E_n < 1 \text{ MeV} \\ 5,0 + 17,0e^{-[1n(2E_n)]^2/6} & 1 \text{ MeV} \leq E_n \leq 50 \text{ MeV} \\ 2,5 + 3,25e^{-[1n(0,04E_n)]^2/6} & E_n < 50 \text{ MeV} \end{cases}$$

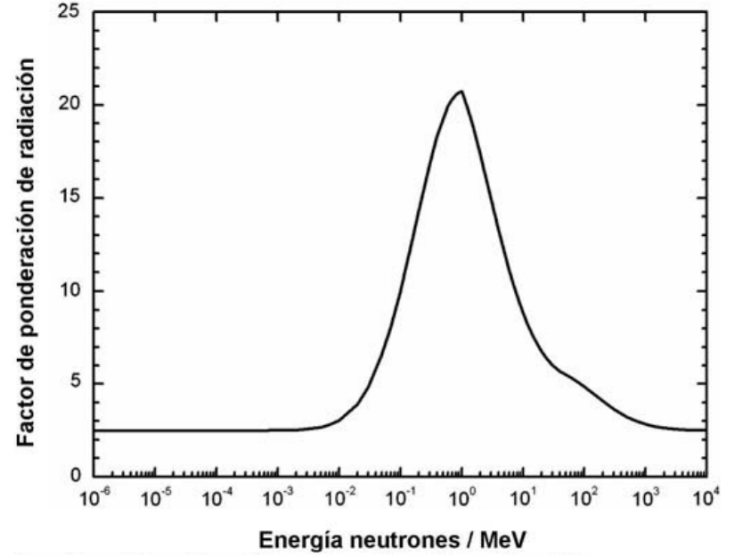


Figura B.1: Factor de ponderación de los neutrones como función de su energía.

Tejido	w_T	$\sum w_T$
Medula ósea, colon, pulmón, estómago, mama, resto de los tejidos *	0.12	0.72
Gónadas	0.08	0.08
Vejiga, esófago, hígado, tiroides	0.04	0.16
Superficie del hueso, cerebro, glándulas salivales, piel	0.01	0.04
Total		1.00

Tabla B.2: Factores de ponderación recomendados para los tejidos. *Resto de los Tejidos: Adrenales, región extra torácica, vesícula, corazón, riñones, nódulos linfáticos, músculo, mucosa oral, páncreas, próstata, intestino delgado, bazo, timo, útero/cérvix.

Bibliografía

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, (New York: Garland Science, 2002).
- [2] R.E. Lenski, Phenotypic and genomic evolution during a 20000 generation experiment with the bacterium *E. Coli*, in J. Janick, Ed., *Plant Breeding Reviews*, Vol. 24, Part 2 (2004), p. 225.
- [3] Michael J. Wiser, Noah Ribeck, Richard E. Lenski, Long-Term Dynamics of Adaptation in Asexual Populations, *Science* 342 1364 (2013).
- [4] H. Allen Orr, Fitness and its role in evolutionary genetics, *Nat Rev Genet* (2009) 10(8): 531-539.
- [5] Richard E. Lenski, Sumary data from the long-term evolution experiment, <http://myxo.css.msu.edu/ecoli/summdata.html> (2016).
- [6] J.E. Barrick, R.E. Lenski, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 54, 1 (2009).
- [7] J.E. Barrick, D. Su Yu, S. Ho Yoon, H. Jeong, T. Kwang Oh, D. Schneider, R.E. Lenski, J.F. Kim, Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*, *Nature* Vol. 461 (2009).
- [8] C. Raeside, J. Gaffé, D.E. Deatherage, O. Tenaillon, A.M. Briska, R.N. Ptashkin, S. Cruveiller, C. Médigue, R.E. Lenski, J.E. Barrick, D. Schneider, Large chromosomal rearrangements during a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*, *mBio* (2014) 5(5): e01377-14.
- [9] C. Tomasetti, B. Vogelstein, Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions, *Science* 347 (2015), pp. 78-81.
- [10] Recomendaciones de la Comisión Internacional de Protección Radiológica, editada por la Sociedad Española de Protección Radiológica con la autorización de la International Commission on Radiological Protection (ICRP), ICRP número 103 (2007).

- [11] Ionizing Radiation Exposure of the Population of the United States, Recommendations of the National Council on Radiation Protection and Measurements, NCRP report no. 160, <http://NCRPpublications.org> (2009).
- [12] Health Effects of Exposure to Radon, Committee on Health Risks of Exposure to Radon (BEIR VI), National Research Council, <http://www.nap.edu/catalog/5499.html> (1999).
- [13] A. González, The long-tail distribution function of mutation in bacteria, *Revista Cubana de Física*, Vol. 32, 86 (2015).
- [14] A. González, Levy model of cancer, arXiv:1507.08232.
- [15] V. S. Koroliuk, N. I. Portenko, A. V. Skorjod, A. F. Turbin, Handbook on probability theory and mathematical statistics, (Nauka, Moscow, 1978).
- [16] A. L. Goldberger, S. Havlin, R.N. Mantegna, M. E. Matsu, C. K. Peng, M. Simons, H. E. Stanley, Long-range correlation properties of coding and noncoding DNA sequences: GenBank analysis, *Physical Review E*, Vol. 51, número. 5, (1995).
- [17] C. K. Peng, S. V. Buldyrev, A. L. Goldberger, F. Sciortino, M. Simons, H. E. Stanley, Fractal landscape analysis of DNA walks, *Physica A* 191 (1992) pp. 25-29.
- [18] T. D. Schneider, Information and entropy of patterns in genetic switches, In G. J. Erickson and C. R. Smith, Eds., *Maximum-Entropy, Bayesian Methods in Science and Engineering*, Vol. 2, (Dordrecht, Kluwer Academic, 1988), pp. 147-154.
- [19] Sergey V. Buldyrev, Generalized Levy-walk model for DNA nucleotide sequences, *Physical Review E*, Vol. 47, número. 6, (1996).
- [20] Eds. M. F. Shlesinger, G. Zaslavsky, U. Frish, *Levy flights and related phenomena in Physics*, *Lecture Notes in Physics*, Springer, Vol. 450, (Berlin, 1995).
- [21] Chang-Yong Lee, Xin Yao, *IEEE Trans. Evol. Comp.*, Vol. 8, No. 1, pp 1, (2004).
- [22] S. Nuismer, *Lecture Notes for Evolutionary Ecology* 548. Lecture #2: Fitness, Selection, and Adaptation, (University of Idaho 2011).
- [23] Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blazquez J., High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288 (2000) p1251 - 1254.
- [24] Steven A. Frank, *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*, Princeton series in evolutionary biology (U.K. 2007), <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>
- [25] ASTAR: Stopping power and range tables for alpha particles, <http://physics.nist.gov/cgi-bin/star/ap-table.pl>
- [26] Genome Browser Gateway University of California Santa Cruz, <http://genome.ucsc.edu>

- [27] Dario León, Augusto González, Mutations as Levy flights, arXiv: 1605.09697
- [28] L.L. Mays Hoopes, Aging and cell division, Nature Education 3 (2010) p55.
- [29] Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Department of Health and Human Services Centers of Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/exposurereport> (2009).